

**Gerichtete Proteinevolution als Werkzeug zur
Generierung funktionell und strukturell neuartiger Proteine**

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

dem
Fachbereich Chemie
der Philipps-Universität Marburg
vorgelegt von

Daniel Garbe

aus Höxter

Marburg/Lahn, 2009

vom Fachbereich Chemie

der Philipps-Universität Marburg als Dissertation

angenommen am: _____

Erstgutachter: Herr Professor Dr. Henning D. Mootz

Zweitgutachter: Herr Professor Dr. Lars-Oliver Essen

Tag der mündlichen Prüfung am: 29. Mai 2009

*Der Pfad zur Weisheit? - Nun, das kann klar
und einfach erklärt werden:
Irren, irren und wiederum irren,
aber immer seltener und seltener und seltener.*

Piet Hein (1905-1996, Poet und Wissenschaftler)

Zusammenfassung

Proteine mit neuartiger oder verbesserter Funktionalität sind in der Industrie und der Grundlagenforschung von großem Interesse. Im Rahmen dieser Doktorarbeit wurden zwei Verfahren der gerichteten Proteinevolution, das Hefe-2-Hybridsystem und das Phagen-Display, verwendet und auf die Anforderungen für zwei unterschiedliche Proteine adaptiert.

Im ersten Projekt sollte ein neuer Ansatz zur Generierung eines mit organischen Molekülen schaltbaren Proteins entwickelt werden. Die Bindestelle des Effektormoleküls sollte *de novo* im hydrophoben Kern des Modellproteins, der SH3-Domäne der c-Abl Tyrosinkinase, evolviert werden. Dazu wurde in einem ersten Schritt die kleine Aminosäure Ala4 des hydrophoben Kerns durch die sterisch anspruchsvollen Aminosäuren Val und Phe ersetzt. Nach Anpassung der Proteinfaltung durch geeignete Mutationen sollten diese Platzhalter nach Rückmutation eine Kavität für das Effektormolekül hinterlassen. Während die Val-Mutation toleriert wurde und biochemisch durch CD-Spektroskopie und in der Ligandenbindung charakterisiert werden konnte, bewirkte die Phe-Mutation offensichtlich eine Entfaltung der SH3-Domäne. Mit dem Hefe-2-Hybridsystem als Selektionsmethode wurde ein Ansatz entwickelt, um durch Proteinevolution kompensierende Mutationen zu identifizieren, die erneut zu einer stabilen Proteinfaltung führen. Es wurden Fusionskonstrukte aus der DNA-Bindedomäne LexA und der B42-Aktivator-domäne mit dem Peptidliganden und der SH3-Domäne hergestellt, so dass eine Interaktion die Transkription der Reportergene *LEU2* und *lacZ* bewirkte. Von der SH3-Domäne wurden auf DNA-Ebene Bibliotheken hergestellt, die entweder durch epPCR oder durch Zufallsmutagenese von fünf Aminosäuren des hydrophoben Kerns (L16, I18, L24, V47 und I52) mittels einer rekursiven PCR gewonnen wurden. Nach der genetischen Selektion erhaltene Hefekolonien wurden als Kandidaten weiter untersucht. Dabei wurde in hohem Maße das Auftreten von falsch Positiven beobachtet, sodass eine Umorganisation des hydrophoben Kerns nicht erreicht werden konnte.

Im zweiten Projekt wurde erstmals ein auf Phagen-Display beruhendes Selektionschema für die Verbesserung von gespaltenen Inteinen entwickelt. Inteine sind interne Proteine, die sich aus einem Vorläuferprotein unter Verknüpfung der flankierenden Polypeptidketten (N- und C-Extein) autokatalytisch entfernen. Diese Reaktion wird als Proteinspleißen bezeichnet. In gespaltenen Inteinen müssen zunächst das N- und das C-terminale Inteinfragment (Int^N bzw. Int^C) assoziieren. In dieser Arbeit wurde mit dem künstlich an Position 11 sowie Position 104 gespaltenen DnaB-Intein aus *Synechocystis* sp. PCC6803 gearbeitet. Mit erstgenanntem System ließe sich in Zukunft auch der Einbau eines organischer Bausteins anstelle der sterisch anspruchsvollen proteinogenen Aminosäure (vergl. Ala4Phe) im ersten Projekt realisieren.

Ein Int^N(104)-Fusionsprotein wurde mit dem M13-Phagen, der das komplementäre Int^C-Fragment präsentierte, inkubiert und die Spleißreaktion durch Immunoblotting nachgewiesen. Anschließend wurde das Int^N(104)-Fusionsprotein durch ein N-terminales Streptavidin-bindendes Peptid (SBP) an Streptavidin-Beads immobilisiert. Die aus der Spleißreaktion resultierenden SBP-Phagenpartikel konnten kompetitiv mit Biotin eluiert werden. Mit diesem Protokoll gelang es, aus einer 1:10.000 Mischung mit einem nicht spleißaktiven Kontrollphagen den Hybridphagen über fünf Selektionszyklen um den Faktor 1250 anzureichern.

Für das an Position 11 gesplattene DnaB-Intein konnte ebenfalls durch Präsentation des Int^C(11)-Fusionsproteins auf der Phagenoberfläche und Inkubation mit einem synthetischen Int^N(11)-Fusionspeptid die Modifikation des Phagenproteins durch Protein-Spleißen gezeigt werden. Dabei wurde Desthiobiotin als N-terminale Peptidmodifikation übertragen, wodurch die Phagen an Streptavidin-Beads gebunden werden konnten. So konnte ein Protokoll etabliert werden, das in fünf Zyklen die Anreicherung des Hybridphagen aus einer 1:10.000

Mischung mit einem nicht spleißaktiven Kontrollphagen um den durchschnittlichen Faktor 290 gestattete.

Schließlich wurde der Einfluss der Aminosäure an Position +2 des C-Exteins auf die Aktivität des an Position 104 gespaltenen DnaB-Inteins anhand von gereinigten Proteinen untersucht. Hierzu wurde mit einem degenerierten Oligonukleotid an jener Position eine sättigende Mutagenese durchgeführt. Neben der natürlich vorkommenden Aminosäure Ile zeigte von den untersuchten Aminosäuren vor allem Ala einen positiven Einfluss auf die Bildung des Spleißproduktes in einer *in vitro* Spleißreaktion, während z.B. Pro einen inhibierenden Effekt hatten.

Summary

Proteins bearing new or improved functionalities are very important in industry and basic research. This PhD thesis deals with two directed protein evolution methods, the yeast-2-hybrid system and phage display, which were adopted to the needs of two different proteins.

The aim of the first project was to develop a protein that can be artificially switched by an organic molecule. This molecule should bind in a newly created cavity established in the hydrophobic core of the model protein, the SH3 domain of the c-Abl tyrosine kinase. To this end the small hydrophobic core amino acid Ala4 was replaced in a first step by the bulky Val and Phe. Following the adaptation of the protein folding to this steric constraint, a back-mutation was intended to reveal a new cavity for binding of the organic molecule. Unlike the Phe mutant, the Val substitution was tolerated by the protein fold and allowed its biochemical characterisation by CD-spectroscopy and a peptide ligand binding assay. A protein evolution approach using a yeast-2-hybrid selection system was developed to identify compensating mutations in the A4F mutant in order to stabilize again the hydrophobic core. Fusion constructs of the B42 activator domain and the DNA binding domain LexA with the peptide ligand and the SH3 domain were created. An interaction between the SH3 domain and the ligand was necessary to promote transcription of the reporter genes *LEU2* and *lacZ*. Two libraries of the SH3 domain were prepared on the DNA-level, one by epPCR and the other by focussed random mutagenesis of the five remaining amino acids of the hydrophobic core (L16, I18, L24, V47 and I52). Genetically selected yeast colonies were further characterised. However, it was noticed that a large number of the selected yeast cells were false positives. Hence the reorganisation of the hydrophobic core could not be accomplished.

In the second project a phage display scheme to select for split inteins with improved activity was developed for the first time. Inteins are internal proteins that excise themselves in an autocatalytic fashion from a precursor protein with concomitant linkage of two flanking polypeptide chains (N- and C-extein). This reaction is referred to as protein splicing. In split inteins the N- and C-extein fragments have to associate before the splicing reaction. The object of this project was the DnaB intein from *Synechocystis* sp. PCC6803, which was artificially split either at position 11 or at position 104.

Protein splicing was shown between an Int^N(104) fusion protein and an M13-Phage presenting the complementary Int^C fragment. Subsequently, the Int^N(104) fusion protein was immobilised on streptavidin beads via its N-terminal streptavidin binding peptide (SBP). The resulting splice product (SBP-phage) could be specifically eluted from the beads with biotin. Following this protocol it was possible to enrich the hybrid-phage from a 1:10,000 mixture with a control-phage incompetent for protein splicing. After five rounds of biopanning an enrichment factor of 1,250 was obtained.

In experiments with the DnaB intein split at position 11 a fairly different protocol was used. In this case, the N-terminal modification desthiobiotin of a synthetic Int^N(11) peptide was transferred to the splice product, which could then be immobilized on streptavidin beads. By this protocol, an enrichment of the hybrid-phage from a 1:10,000 mixture with a control-phage by an average factor of 290 was accomplished.

Finally the influence of the amino acid at position +2 of the C-extein on the splicing activity of the DnaB intein split at position 104 was examined using purified proteins. To this end a saturated mutagenesis with a degenerated oligonucleotide was applied at this position. Besides the naturally occurring isoleucine, alanine showed a positive influence, whereas Pro caused an inhibitory effect on the progress of the *in vitro* protein *trans*-splicing reaction.

Inhaltsverzeichnis

<i>Zusammenfassung</i>	<i>I</i>
<i>Summary</i>	<i>III</i>
<i>Inhaltsverzeichnis</i>	<i>IV</i>
<i>Abkürzungsverzeichnis</i>	<i>VIII</i>
1- und 3-Buchstabencode für Aminosäuren sowie die relative, molare Masse für die entsprechenden Aminosäurereste.....	IX
1. Einführung in das Thema Proteinevolution	1
1.1. Rationelle Überlegungen bei der Erstellung einer DNA-Bibliothek	3
1.2. Generierung von DNA-Bibliotheken mittels gerichteter Evolution	4
1.2.1. Fehleranfällige Polymerase-Kettenreaktion	5
1.2.2. DNA shuffling.....	6
1.2.3. Schrittweises Verlängerungs-Protokoll (StEP)	7
1.2.4. Inkrementelle Verkürzung zur Schaffung von Hybridenzymen.....	8
1.2.5. DNA-Rekombination unabhängig von der Sequenzhomologie	10
1.2.6. Technologie zum Austausch und Herausschneiden von Nukleotiden.....	11
1.3. Präsentationsmethoden - Die Verbindung zwischen Geno- und Phänotyp	12
1.3.1. <i>In vitro</i> Kompartimentierung.....	12
1.3.2. Präsentation auf dem Ribosom.....	14
1.3.3. mRNA-Peptid-Fusionstechnologie	15
1.3.4. Präsentation auf der Zelloberfläche.....	16
1.3.5. Präsentation auf der Oberfläche eines Bakteriophagen	18
1.3.6. Präsentation auf der Oberfläche des Baculovirus.....	24
1.3.7. Die <i>n</i> -Hybridsysteme.....	25
2. Einleitung zur Entwicklung eines schaltbaren Proteins (Projekt 1)	35
2.1. Kontrolle von Proteinfunktionen durch molekulare Schalter	35
2.1.1. Natürliche Schalter	35
2.1.2. Schaltung mittels induzierter Dimerisierung von Proteindomänen.....	36
2.1.3. Kontrolle über zusätzliche Ligandbindemotive.....	38
2.1.4. Die <i>bump and hole</i> -Strategie.....	39
2.1.5. Einführung von <i>de novo</i> -Bindestellen	41
2.2. Das Modellsystem: Die SH3-Domäne der c-Abl Tyrosin Kinase	44
2.2.1. Struktur und negative Regulation der c-Abl Tyrosin-Kinase	44
2.2.2. Untersuchungen der Bindung von Liganden an die Abl SH3-Domäne.....	46
2.2.3. Mögliche Evolution des Ligandbindemotivs.....	48
2.2.4. SH3-Domänen als Modellsysteme für den hydrophoben Kern von Proteinen.....	49
2.3. Aufgabenstellung: Eine schaltbare c-Abl SH3-Domäne (Projekt 1)	50
3. Materialien zu Projekt 1	53
3.1. Verwendete Geräte	53
3.2. Chemikalien, Enzyme und Verbrauchsmaterialien	55
3.3. Verwendete Plasmide	57
3.3.1. pET16b.....	57
3.3.2. pTrc99a	57
3.3.3. pGILDA	57
3.3.4. pB42AD	58
3.3.5. p8opLacZ	58

3.4. Mikroorganismen.....	58
3.4.1. <i>Escherichia coli</i> -Stämme	58
3.4.2. <i>Saccharomyces cerevisiae</i> -Stamm	59
3.5. Medien.....	59
3.5.1. Medien zur Anzucht von <i>E. coli</i> -Kulturen	59
3.5.2. Medium zur Anzucht von <i>S. cerevisiae</i> -Kulturen	60
3.6. Puffer und Lösungen	61
4. Methoden zu Projekt 1	64
4.1. Molekularbiologische Techniken.....	64
4.1.1. Konstruktion der Expressionsplasmide	64
4.1.2. Generierung einer DNA-Bibliothek via epPCR oder rekursive PCR	66
4.1.3. Sequenzierung der Plasmide und PCR-Produkte	67
4.2. Techniken im Zusammenhang mit den Hefe-2-Hybridexperimenten	68
4.2.1. Transformation von Hefezellen mit Plasmid-DNA	68
4.2.2. Fortführung des Hefe-2-Hybridsystems nach der Transformation	69
4.2.3. Der Kolonie-Lift Filterassay mit X-Gal	69
4.2.4. Bestimmung der β -Galaktosidase-Aktivität mittels ONPG-Assay	70
4.2.5. Plasmid-Präparation und deren Vereinzelung	71
4.3. Protein-Techniken.....	71
4.3.1. Genexpression in <i>E. coli</i>	72
4.3.2. Zellaufschluss.....	72
4.3.3. Chromatographische Proteinaufreinigung	73
4.3.3.1. Affinitätschromatographie an immobilisierten Ni^{2+} -Ionen	73
4.3.3.2. Erhöhung der Proteinreinheit durch Gelfiltrations-Chromatographie	74
4.3.4. Die Western-Blot-Analytik	74
4.4. Peptidchemie	75
4.4.1. Allgemeine Arbeitsvorschrift für die automatisierte Peptidsynthese	76
4.4.2. Abspaltung vom Harz und Entschützung der Seitenketten	76
4.4.3. Peptidreinigung mittels präparativer HPLC	77
4.4.4. Photometrische Bestimmung der Peptidkonzentration	77
4.5. Analytische Methoden	78
4.5.1. Analytische Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC)	78
4.5.2. MALDI-TOF-Massenspektrometrie	78
4.5.3. Theoretischer Hintergrund zur Bestimmung der Dissoziationskonstanten	79
4.5.4. Experimentelle Durchführung der Fluoreszenztitration	81
4.5.5. Theorie der Circular dichroismus-Spektroskopie	81
4.5.6. Bestimmung der Sekundärstruktur mittels Circular dichroismus-Spektroskopie	84
4.5.7. Thermisch-induzierte Proteinentfaltung	84
5. Ergebnisse zur Entwicklung einer schaltbaren <i>c-Abl SH3</i>-Domäne (Projekt 1)	85
5.1. Vorarbeiten.....	86
5.1.1. Expression der natürlichen SH3-Domäne und der Ala4-Mutanten	86
5.1.2. Bestimmung der Dissoziationskonstanten (K_d)	87
5.1.3. Analyse der Sekundärstruktur durch CD-Spektroskopie	89
5.1.4. Bestimmung der Schmelzpunkte	90
5.1.5. Die A4W/I18A-Doppelmutante der natürlichen SH3-Domäne	91
5.2. Proteinevolution mit Hilfe eines Hefe-2-Hybridsystems	92
5.2.1. epPCR zur Mutagenese der gesamten SH3-Sequenz (Bibliothek 1)	92
5.2.2. Gezielte Mutationen in der SH3-Domäne durch rekursive PCR	94
5.2.3. Test auf Wachstum, Autoaktivierung und Einschleusung in den Zellkern	95
5.2.4. Proteinevolution basierend auf den DNA-Bibliotheken	103
5.2.5. Quantitative Bestimmung der Interaktion mittels ONPG-Assay	107

6.	<i>Diskussion zur Entwicklung einer schaltbaren c-Abl SH3-Domäne (Projekt 1)</i>	111
6.1.	Ausgangspunkt: Die natürliche c-Abl SH3-Domäne	111
6.2.	Mutanten des hydrophoben Kerns der Fyn und der c-Abl SH3	113
6.3.	Das Hefe-2-Hybridsystem zur Selektion stabiler SH3-Domänen	117
6.4.	Ausblick für Projekt 1	118
7.	<i>Einleitung zum trans-Proteinspleißen an der Bakteriophagen-Hülle</i>	122
7.1.	Inteine: Struktur und Funktion	122
7.2.	Künstlich gespaltene Inteine und das trans-Proteinspleißen	126
7.3.	Das Ssp DnaB-Intein	128
7.4.	Evolutives Entwicklungspotential am Beispiel des Npu DnaE-Intein	130
7.5.	Aufgabenstellung: Selektion von trans-Proteinspleißen durch Phagen-Display des Ssp DnaB-Inteins (Projekt 2)	131
8.	<i>Materialien zu Projekt 2</i>	134
8.1.	Verwendete Geräte	134
8.2.	Chemikalien, Enzyme und Verbrauchsmaterialien	134
8.3.	Verwendete Plasmide	134
8.3.1.	pET28a	134
8.3.2.	pSU38	134
8.3.3.	pHEN1	135
8.3.4.	pT7-SBP-2	135
8.4.	Mikroorganismen	136
8.4.1.	E. coli-Stamm	136
8.4.2.	Der Helferphage: M13K07	136
8.5.	Medien	136
8.5.1.	Zur Anzucht von nicht-infizierten E. coli-Kulturen	136
8.5.2.	Zur Anzucht von infizierten bzw. zu infizierenden E. coli-Kulturen	137
8.6.	Puffer und Lösungen	137
9.	<i>Methoden zu Projekt 2</i>	140
9.1.	Molekularbiologische Techniken	140
9.1.1.	Konstruktion der Expressions- und Phagemidplasmide	140
9.2.	Protein-Techniken	143
9.2.1.	Chromatographische Proteinaufreinigung	143
9.2.1.1.	Affinitätschromatographie mittels des StrepII-Tags	143
9.2.1.2.	Affinitätschromatographie an immobilisierter Amylose	144
9.2.2.	Modifikation von Proteinen mit dem Biotin-X-NHS-Reagenz	144
9.2.3.	„Strippen“ von Membranen für Western-Blots	145
9.3.	Peptidchemie	145
9.3.1.	Allgemeine Arbeitsvorschrift für die automatisierte Peptidsynthese	146
9.4.	Techniken zur Durchführung des Phagen-Display	146
9.4.1.	Präparation von Phagenpartikeln	147
9.4.2.	Titerung von Phagenpartikeln durch Infektion von Bakterienzellen	148
9.4.3.	Titerung der Helferphagen durch Infektion von Bakterienzellen	149
9.4.4.	Der Phagen-ELISA	149
9.4.5.	Durchführung eines Biopanning-Schrittes	150
9.4.5.1.	Biopanning mit dem an Position 104 gespaltenen Ssp DnaB-Intein	150
9.4.5.2.	Biopanning mit dem an Position 11 gespaltenen Ssp DnaB-Intein	152

9.5. Analytische Methoden	154
9.5.1. Der tryptische Verdau von Proteinen in SDS-Gelen	154
10. Ergebnisse zur Proteinevolution des Ssp DnaB-Inteins mittels Phagen-Display (Projekt 2).....	155
10.1. Trans-Proteinspleißen des Phagen-präsentierten DnaB^C (107-154).....	155
10.1.1. Spleißen des Phagen-präsentierten DnaB ^C (107-154) mit Protein 11 (DnaB ^N (1-104))	156
10.1.2. Die Anreicherung des Hybridphagen (DnaB ^C (107-154)) (Teil 1)	162
10.1.3. Spleißen des Phagen-präsentierten DnaB ^C (107-154) mit Protein 24 (SBP-DnaB ^N (1-104))	165
10.1.4. Optimierung der Bedingungen für Spleißen mit DnaB ^C (107-154).....	168
10.1.5. Die Anreicherung des Hybridphagen (DnaB ^C (107-154)) (Teil 2).....	170
10.2. Trans-Proteinspleißen des Phagen-präsentierten DnaB^C (12-154).....	172
10.2.1. Spleißen des Phagen-präsentierten DnaB ^C (12-154) mit Pep2 (DTB-DnaB ^N (1-11))	174
10.2.2. Untersuchungen zu unspezifischen Interaktionen des Pep2 (DTB-DnaB ^N (1-11))	178
10.2.3. Die Anreicherung des Hybridphagen (DnaB ^C (12-154)).....	180
10.3. Auswirkung der Aminosäure an Position +2 auf das trans-Proteinspleißen des an Position 104 gespaltenen Ssp DnaB	183
10.3.1. Erzeugung einer DNA-Bibliothek an Position +2	183
10.3.2. Auswertung der trans-Proteinspleiß-Reaktionen der ausgewählten Mutanten der +2-Bibliothek.....	185
11. Diskussion zur Proteinevolution des Ssp DnaB-Inteins mittels Phagen-Display (Projekt 2).....	187
11.1. Entwicklung einer Phagen-Display-Methode für gespaltene Inteine	187
11.2. Modifikation von Proteinen und Peptiden auf der Phagenoberfläche.....	192
11.3. Komplementierung von Proteinen durch Assoziation der Fragmente	196
11.4. Ausblick zum Phagen-Display mit dem gespaltenen DnaB-Intein	198
11.4.1. Mögliche Verbesserungen des bestehenden Systems	198
11.4.2. Alternative Phagen-Display-Strategien	200
11.4.2.1. Das oligovalente Phagen-Display.....	200
11.4.2.2. Polyvalentes Phagen-Display mit selektiv infektiösen Phagen.....	202
11.4.3. Strategien zum Aufbau von DNA-Bibliotheken.....	203
11.5. Der Einfluss der Bibliothek an Position +2 auf die Spleißreaktion: Ein Vergleich mit dem Ssp DnaE-Intein	204
12. Literaturverzeichnis.....	207
13. Anhang.....	220
14. Danksagung.....	226
Erklärung.....	227

Abkürzungsverzeichnis

ΔpIII	Aminosäuren 250-406 des Hüllproteins III des M13-Bakteriophagen	HBTU	<i>O</i> -(Benzotriazol-1-yl)- <i>N,N,N',N'</i> -tetramethyluroniumhexafluorophosphat
Abl SH3	SH3-Domäne der c-Abl Tyrosinkinase	HPLC	Hochleistungsflüssigchromatographie (engl. <i>high performance liquid chromatography</i>)
AcOH	Essigsäure	IMAC	immobilisierte Metallionen-Affinitätschromatographie
APS	Ammoniumperoxodisulfat	MBP	Maltose-bindendes Protein
B42 AD	B42-Aktivator-domäne	MCS	<i>Multiple cloning site</i>
ber.	berechnet	MS	Massenspektrometrie
Boc	<i>tert</i> -Butyloxycarbonyl-Schutzgruppe	n.d.	nicht detektiert
Da	Dalton	nat. SH3	natürliche SH3-Domäne
DIPEA	<i>N,N</i> -Diisopropyl- <i>N</i> -ethylamin	OD	Optische Dichte
DMF	<i>N,N</i> -Dimethylformamid	pIII	Hüllprotein III des M13-Bakteriophagen
DMSO	Dimethylsulfoxid	PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
DnaB^C	C-terminales Fragment des künstlich, gespaltenen DnaB-Intein	PelB SS	Signalsequenz der Pektat-Lyase B
DnaB^N	N-terminales Fragment des künstlich, gespaltenen DnaB-Intein	TOF	Flugzeit (engl. <i>time of flight</i>)
DTB	Desthiobiotin	TRIS	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
eq	Äquivalent(e)	Trx	Thioredoxin
Fmoc	9-Fluorenylmethoxycarbonyl-Schutzgruppe	Upm	Umdrehungen pro Minute
FPLC	schnelle Protein-Flüssigchromatographie (engl. <i>fast protein liquid chromatography</i>)	v/v	Volumen pro Volumen (engl. <i>volume per volume</i>)
gef.	gefunden	w/v	Gewicht pro Volumen (engl. <i>weight per volume</i>)
gpD	Kopfprotein des λ -Bakteriophagen		

1- und 3-Buchstabencode für Aminosäuren sowie die relative, molare Masse für die entsprechenden Aminosäurereste

Aminosäure	1-Buchstabencode	3-Buchstabencode	relative, molare Masse des Aminosäurerestes [g/mol]
Alanin	A	Ala	71,08 (C ₃ H ₅ NO)
Arginin	R	Arg	156,19 (C ₆ H ₁₂ N ₄ O)
Asparagin	N	Asn	114,10 (C ₄ H ₆ N ₂ O ₂)
Aspartat	D	Asp	115,09 (C ₄ H ₅ NO ₃)
Cystein	C	Cys	103,15 (C ₃ H ₅ NOS)
Glutamat	E	Glu	129,12 (C ₅ H ₇ NO ₃)
Glutamin	Q	Gln	128,13 (C ₅ H ₈ N ₂ O ₂)
Glycin	G	Gly	57,05 (C ₂ H ₃ NO)
Histidin	H	His	137,14 (C ₆ H ₇ N ₃ O)
Isoleucin	I	Ile	113,16 (C ₆ H ₁₁ NO)
Leucin	L	Leu	113,16 (C ₆ H ₁₁ NO)
Lysin	K	Lys	128,17 (C ₆ H ₁₂ N ₂ O)
Methionin	M	Met	131,20 (C ₅ H ₉ NOS)
Phenylalanin	F	Phe	147,18 (C ₉ H ₉ NO)
Prolin	P	Pro	97,12 (C ₅ H ₇ NO)
Serin	S	Ser	87,08 (C ₃ H ₅ NO ₂)
Threonin	T	Thr	101,11 (C ₄ H ₇ NO ₂)
Tryptophan	W	Trp	186,21 (C ₁₁ H ₁₀ N ₂ O)
Tyrosin	Y	Tyr	163,18 (C ₉ H ₉ NO ₂)
Valin	V	Val	99,13 (C ₅ H ₉ NO)

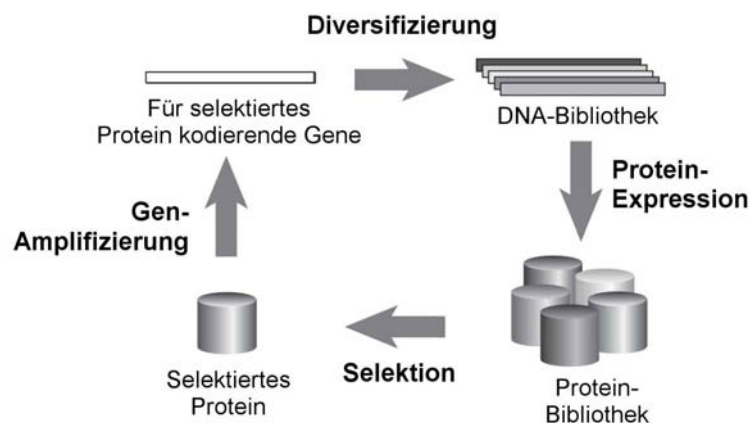
1. Einführung in das Thema Proteinevolution

Paley [1] folgert aus dem Fund einer Uhr durch einen Wanderer, dass es einen Uhrmacher geben muss, der jene Uhr angefertigt hat. Wenn aber nun so etwas Simples, wie z. B. eine Uhr schon einen Erfinder benötigt, wie sieht es dann mit der gesamten Natur und ihren komplexen Abläufen aus? Hieraus erwächst für Paley und heutzutage auch für die Kreationismus-Bewegung die Notwendigkeit eines Schöpfers, der alles erschaffen hat, welchen sie Gott nennen.

Bei Betrachtung der Natur durch die Brille der Naturwissenschaften und Behandlung der Frage, wie alles entstanden sein könnte, landet man früher oder später bei der vor 150 Jahren publizierten Evolutionstheorie. Diese von Darwin [2] postulierte Theorie beinhaltet unter dem Motto „*survival of the fittest*“ als Kernaussage, dass diejenige Art bzw. das Individuum einer Art am ehesten überlebt und daher seine Gene durch Vererbung fortpflanzen kann, das die beste Anpassung an die gegebenen Umweltbedingungen besitzt. Diese Anpassung ist ein Ergebnis des sich ständig vollziehenden Evolutions-Prozesses, der aus zufälliger Mutation auf Genomebene und anschließender Selektion des daraus resultierenden Phänotyps durch die herrschenden Umweltbedingungen besteht. Die Zufälligkeit der sogenannten natürlichen Zuchtwahl veranlasste Dawkins im Jahre 1986 in Analogie zum vorstehend erwähnten Uhrmacher vom „*blind watchmaker*“ [3] zu sprechen.

In der heutigen Zeit, die auch als Postgenom-Ära bezeichnet wird, konzentriert sich die wissenschaftliche Arbeit auf die Charakterisierung der unzähligen in Pro- und Eukaryoten vorliegenden Proteine. Hierbei verfolgt ein Teil der Wissenschaftler den Ansatz der Grundlagenforschung im Hinblick auf das Vorkommen eines Proteins in der Zelle und seine dortigen Aufgaben, ein anderer Teil versucht durch den Einsatz von z. B. Enzymen, die Effizienz komplexer und kostenintensiver Prozesse in der pharmazeutischen oder chemischen Industrie zu erhöhen. Allen ist aber gemein, dass sie versuchen, Proteine zu verbessern, indem sie die Evolution der Natur im begrenzten Maßstab ins Labor übertragen und dort durch neu entwickelte Methoden beschleunigt ablaufen lassen. Jede Proteinevolution im Labor umfasst vier Schritte (Abbildung 1). Am Anfang steht immer die Generierung einer DNA-Bibliothek, die, durch zufällige oder gezielte Mutation einer oder mehrerer Basen, den Bauplan für die Ausbildung von Bibliotheken mit z. T. nur in Nuancen unterschiedlicher Proteine besitzt. Daraufhin müssen die Sequenzen der DNA-Bibliothek in mRNA transkribiert und schließlich in Proteine translatiert werden. In diesem Stadium ist es wichtig die Verbindung zwischen der Bibliothek auf DNA-Ebene (Genotyp) und den daraus resultierenden Proteinen (Phänotyp) nicht zu unterbrechen. Besagte Verbindung zwischen Geno- und Phänotyp muss auch den

nächsten Schritt, den sogenannten Selektionsschritt, unbeschadet überstehen können. Bei der Selektion werden die erhaltenen Proteine auf ihr Verhalten gegenüber meist künstlich herbeigeführte Randbedingungen untersucht und überwiegend diejenigen Proteine zurückgewonnen, die sich gegenüber den ausgewählten Selektionskriterien als am Besten angepasst gezeigt haben. Abschließend kann aufgrund der Kopplung von Geno- und Phänotyp die genetische Information der selektierten Proteine isoliert werden. Die selektierten DNA-Sequenzen können nun entweder erneut dem vorstehend beschriebenen Ablauf unterworfen werden oder die DNA wird vereinzelt, meistens ihre Basenabfolge bestimmt und die aus ihr hervorgehenden Proteine biochemisch weiter untersucht.



Diversifizierung der DNA:

- Rationelle Überlegungen 1.1
- Gerichtete Evolution..... 1.2
 - epPCR..... 1.2.1
 - DNA shuffling 1.2.2
 - StEP 1.2.3
 - ITCHY/SCRATCHY 1.2.4
 - SHIPREC 1.2.5
 - NExT 1.2.6

Protein-Expression / Selektion:

- *in vitro* Kompartimentierung 1.3.1
- Präsentation auf dem Ribosom 1.3.2
- mRNA-Peptid-Fusionstechnologie 1.3.3
- Präsentation auf der Zelloberfläche 1.3.4
- Präsentation auf dem Bakteriophagen..... 1.3.5
- Präsentation auf dem Baculovirus 1.3.6
- *n*-Hybridsystem..... 1.3.7

Abbildung 1. Prinzip der Proteinevolution. Zunächst wird das für das interessierende Protein kodierende Gen durch eine Mutagenese-Methode randomisiert. Basierend auf der resultierenden DNA-Bibliothek werden die darin kodierten Proteine exprimiert und auf die gewünschte Eigenschaft selektiert. Das dem selektierten Protein entsprechende Gen wird isoliert und amplifiziert. Anschließend kann dieses Gen dem Zyklus neu unterworfen werden. Eine ausführliche Beschreibung der Methoden zur Diversifizierung der DNA und der Protein-Expression/Selektion kann den angegebenen Kapiteln entnommen werden.

Im Hinblick auf die Proteine werden unterschiedliche Ziele verfolgt. Ein Interessensgebiet liegt in der Struktur-Funktions-Beziehung einzelner Proteine, um in Zukunft Enzyme mit geforderten Funktionen *in silico* zu erschaffen und sie anschließend im Labor *de novo* zu syn-

thetisieren. Ein hierfür aktuelles Beispiel bildet, die Generierung eines Enzyms das Basen-katalysiert die Abstraktion eines Protons von einem Kohlenstoffatom, dem ersten Teilschritt der Kemp-Eliminierung, für die kein natürlich vorkommendes Enzym existiert, ermöglicht [4]. Auf der anderen Seite werden bestehende Proteine genutzt, um sie künstlich zu verändern, sodass sie z. B. die Bedingungen in der industriellen Großproduktion überstehen oder medizinischen Applikationen zugeführt werden können. Hierbei werden zwei zueinander konträre Ansätze verfolgt: Zum einen wird versucht, Eigenschaften von Enzymen, wie katalytische Aktivität und Resistenz gegenüber pH-Wertveränderungen zu optimieren. Zum anderen sollen in dem Enzym verborgene, nicht für seine Hauptaufgabe notwendige, Funktionen (engl. *promiscuous function*) ans Licht gebracht und in seine katalytische Hauptfunktion transformiert werden [5].

1.1. Rationelle Überlegungen bei der Erstellung einer DNA-Bibliothek

Die nachfolgenden Kapitel sollen den ersten Schritt der Proteinevolution, die Herstellung der DNA-Bibliothek, verdeutlichen. Dies kann durch zwei grundlegend verschiedene Herangehensweisen bewerkstelligt werden. Entweder wird die Gestaltung der DNA-Bibliothek durch rationelle Überlegungen (engl. *rational design*) entwickelt oder sie ist das Produkt einer mehr oder weniger reglementierten Zufallsabfolge von Mutationen (engl. *directed evolution*).

Das *semi-rational design* zeichnet sich durch gezielte Mutation bestimmter Aminosäuren eines Proteins aus. Diese Mutationen werden dann auf DNA-Ebene mit den entsprechenden Kodons verschlüsselt, weshalb dieser Ansatz in der Literatur als *top-down* Verfahren bezeichnet wird. Diese rationellen Überlegungen können auf unterschiedlichen Grundlagen fußen. Zum einen können für ein Protein, das in der Mehrzahl der Fälle ein Enzym darstellt, die zur Funktion notwendigen Aminosäuren biochemisch bestimmt worden sein, im Idealfall liegen sogar Strukturdaten durch NMR-Untersuchungen bzw. Röntgenstrahlbeugung mit Proteinkristallen vor. Zum anderen können Struktur motive mit gewünschten katalytischen Eigenschaften vollständig in andere Proteine, die nur als Gerüst dienen, überführt werden. Diese als *loop grafting* bezeichnete Möglichkeit der gerichteten Evolution wurde in besonderem Maße auf Antikörper angewandt [6] und konnte mit Hilfe von Computermodellen erfolgreich auf andere Proteine übertragen werden [7, 8].

Nachdem besonders bei vorhandenen Strukturinformationen die zu verändernden Aminosäuren *in silico* bestimmt wurden, kann die DNA gezielt an einer Stelle verändert werden.

Hierzu wird vorrangig das Mittel der Positions-bezogenen Mutagenese (engl. *site-directed mutagenesis*) genutzt (Abbildung 2) [9]. In jenem Verfahren wird eine DNA-Amplifikation mit einem synthetisierten Primer durchgeführt, der an der ausgewählten Stelle das Kodon für die neu festgelegte Aminosäure aufweist. Soll hingegen nicht nur eine einzige Aminosäure an der fraglichen Position getestet werden, muss der einzusetzende Primer eine Degenerierung aufweisen, d. h. ein Gemisch aus einzelnen Oligonukleotidsequenzen sein, die an einer bestimmten Position in der Sequenz verschiedene DNA-Basen aufweisen. Dabei können über die Wahl der verwendeten DNA-Basen (z. B. „N“ steht für alle vier DNA-Basen, „K“ ermöglicht nur die Verwendung von Guanin und Thymin) eines Kodons die resultierenden Aminosäuren wenig oder sehr stark eingeschränkt werden. Die gezielte Wahl der DNA-Basen ermöglicht es darüber hinaus Stop-Kodons, deren Expression auf Proteinebene meist zu unerwünschten Ergebnissen führen, auszuschließen. Von saturierter Mutation spricht man in den Fällen, in denen die genutzten DNA-Basen als Kodon für alle 20 Aminosäuren an jener Position in der Proteinsequenz kodieren.

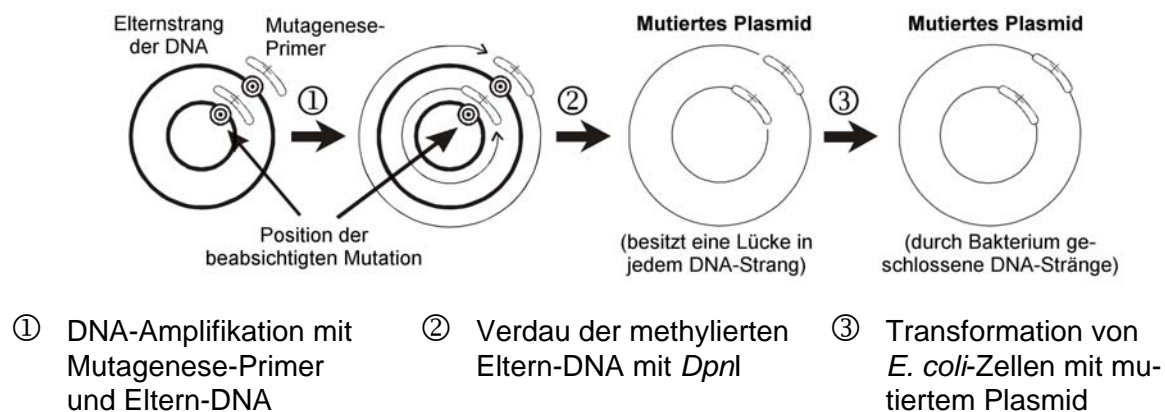


Abbildung 2. Schematische Übersicht des Ablaufes einer Positions-bezogenen Mutagenese-Reaktion. Oligonukleotid-Primer mit der beabsichtigten Mutation und die Eltern-DNA werden in einer Mutagenese-Reaktion eingesetzt, um das mutierte Plasmid aufzubauen. Damit bei der Transformation der *E. coli*-Zellen nur das neue DNA-Amplifikat eingeschleust wird, muss die methylierte Eltern-DNA in einem *DpnI*-Verdau degradiert werden. Die im Amplifikat verbliebenen Lücken werden nach Transformation in *E. coli*-Zellen in diesen geschlossen. (nach [10])

1.2. Generierung von DNA-Bibliotheken mittels gerichteter Evolution

Eine Möglichkeit größere, zufällige Variationen in einem Gen zu erzeugen, stellt die gerichtete Evolution (engl. *directed evolution*) dar. In der Regel wird lediglich die Größe des zu mutierenden Genabschnittes bestimmt und außerdem wird in der PCR die natürliche Fehler-

anfälligkeit bestimmter DNA-Polymerasen ausgenutzt. Da hier die gesamten Mutationen direkt aus den „Verarbeitungsprozessen“ der DNA stammen, wird dieser Ansatz analog zum *top-down* als *bottom-up* Verfahren bezeichnet.

Die während der direkten Evolution zufällig auftretenden Mutationen weisen sowohl Vor- als auch Nachteile auf. Ein Nachteil gegenüber dem semirationellen Ansatz liegt darin, dass die Position der Mutation vorher nicht bestimmbar ist und die Mutationsraten (Häufigkeit von Mutationen in einer Gensequenz) in der Regel so gering ist, dass auf Protein-Ebene die direkten oder übernächsten Nachbarn einer mutierten Aminosäure nicht auch als Mutationen der Ausgangssequenz auftreten. Die vollkommen zufällige Verteilung der Mutationen kann dazu führen, dass sie zwar vorteilhaft für z. B. die enzymatische Wirkung sind, allerdings in keiner direkten räumlichen Nähe zum katalytischen Zentrum auftreten, sondern nur über die Gesamtstruktur des Proteins ihre positive Wirkung entfalten können. Besonders bei solchen Mutationen kann davon ausgegangen werden, dass sie in einem rationellen Ansatz wahrscheinlich gar nicht aufgetreten wären, da hier meistens nur Mutationen im oder an der Peripherie des katalytischen Zentrums untersucht werden. Schließlich gestaltet sich der Einbau mehrerer Mutationen in ein mehrere tausend Basenpaare umfassendes Gensegment mit dem Ansatz der direkten Evolution viel einfacher und zeitsparender, als die Durchführung einer Reihe von hintereinander durchgeführten PCR-Reaktionen mit ortsspezifischen Oligonukleotidprimern.

In den nachfolgenden Kapiteln sollen einige Methoden zur Bildung einer DNA-Bibliothek erläutert und z. T. bewertet werden. Hierbei wird versucht, die chronologische Abfolge der exemplarisch genannten DNA-Mutations-Methoden einzuhalten. Aufgrund der Fülle an Methoden zur Modifikation der DNA, die in den letzten Jahren entwickelt wurden, erhebt die Aufzählung keinen Anspruch auf Vollständigkeit, sondern soll lediglich einen Einblick in das Thema gewähren.

1.2.1. Fehleranfällige Polymerase-Kettenreaktion

Die am weitesten verbreitete Methode zur Veränderung von DNA-Abschnitten ist die Fehleranfällige Polymerasekettenreaktion (engl. *error-prone PCR*, *epPCR*) (Abbildung 3) [11]. Diese Methode nutzt die natürliche Fehlerrate (1 Fehler pro 5000 Nukleotide und Zyklus) der DNA-Polymerase aus dem Bakterium *Thermus aquaticus*, die keine 3'-5'-Korrekturlesefunktion (engl. *proof reading*) besitzt. Es wurde gefunden, dass Modifikationen der normalen

PCR diese Fehlerrate noch erheblich steigern können (durchschnittlich 5 Fehler pro 1000 Nukleotide und PCR). Unter anderem wurde die Magnesiumchlorid-Konzentration erhöht [12], die Reaktion unter Zugabe von Manganchlorid [13] oder einem unausgewogenen Verhältnis an Nukleotiden [14] durchgeführt, ein Gemisch aus Triphosphat-Nukleosid-Analoga in die PCR einbezogen [15] oder schließlich mehrere der genannten Möglichkeiten kombiniert eingesetzt. Zu einer neuen Variante der epPCR gehört die von Claveau *et al.* vorgeschlagene Verwendung von Alkoholen [16], wie *iso*-Propanol, 1-Propanol oder 1-Butanol. Bemerkenswerterweise wird in diesen PCR-Reaktionen nicht, wie sonst für die *Taq*-Polymerase üblich, ein Austausch von Adenosin und Thymin gegeneinander favorisiert, sondern von Cytosin und Guanin. Es wird angenommen, dass dieser Effekt auf eine alkoholbedingte, partielle Destabilisierung der Polymerase zurückzuführen ist.

Um möglichst neutrale DNA-Mutationen einzuführen, d. h. zu verhindern, dass bevorzugt z. B. $A \rightarrow T$ - bzw. $T \rightarrow A$ -Transversionen vorkommen (*Taq*-Polymerase), hat die Firma Stratagene das „GeneMorph II Random Mutagenesis Kit“ entwickelt [17]. Dieses Paket nutzt neben einer verbesserten *Taq*-Polymerase, eine zweite Polymerase namens Mutazyme, die bevorzugt $G \rightarrow A$ - bzw. $C \rightarrow T$ -Transitionen durchführt. Daher gleicht sich der jeweilige durch die Polymerase herbeigeführte Einfluss auf die DNA-Mutationen aus und es entsteht ein fast ausgeglichenes Verhältnis von Transversionen zu Transitionen.

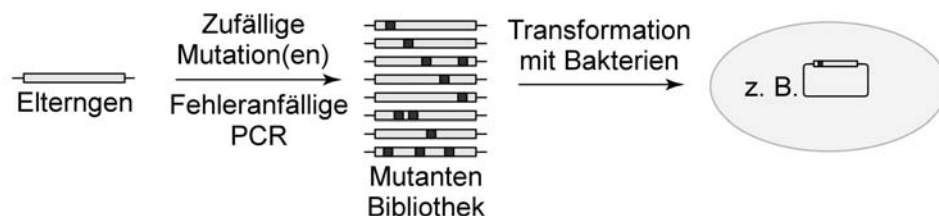


Abbildung 3. Schematische Darstellung der Methode der Fehleranfälligen PCR (epPCR). Bei der epPCR wird eine normale PCR von besonders fehleranfälligen Polymerasen absolviert. (nach [18])

1.2.2. DNA shuffling

Die Methode des *DNA shuffling* [19, 20] (Abbildung 4) erweiterte die epPCR in soweit, dass ein rekombinanter (sexueller) Aspekt in die Generierung der Bibliothek eingeführt wird. Beim *DNA shuffling* werden zunächst Gensequenzen, die eine hohe Homologie zueinander besitzen, durch einen Verdau mit DNase I in kleine Fragmente zerteilt und in einer darauffolgenden PCR zu miteinander vermischten, großen DNA-Abschnitten aufgebaut.

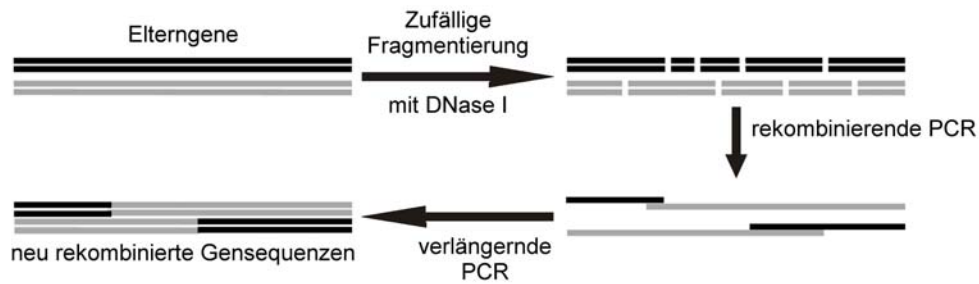


Abbildung 4. Schema der Rekombination in hohem Maße homologer Gensequenzen durch DNA shuffling. Zuerst wird die Eltern-DNA mittels DNase I-Verdau in kleine Fragmente zerlegt. Aufgrund ihrer hohen Homologie können die Fragmente miteinander rekombinieren und dienen dabei als Primer für das jeweils andere Fragment. Abschließend werden die DNA-Sequenzen in einer verlängernden PCR zum vollständigen Produkt aufgefüllt. (nach [21])

Es hat sich gezeigt, dass eine sinnvolle Rekombinationen erst durch Elternsequenzen mit einer Länge größer als 1 kb entstehen. Das hohe Maß an Homologie der Elternsequenzen (mindestens 70%) ist ebenfalls essentiell für eine ausreichende Ausbeute an rekombinantem PCR-Produkt [22]. Schließlich wurde in einer Arbeit von Binkowski *et al.* nachgewiesen, dass während des DNA shuffling-Prozesses eine Subpopulation an DNA-Sequenzen entstehen kann, die eine starke Reduktion in der Diversität aufweist, da „korrekte“ Fragmente leichter miteinander rekombinieren können [23].

1.2.3. Schrittweises Verlängerungs-Protokoll (StEP)

In der Tatsache, dass große Mengen an Eltern-DNA für den Verdau mit DNase I beim DNA shuffling notwendig sind, sah die Arbeitsgruppe um Arnold ein Problem, woraus die Entwicklung des schrittweisen Verlängerungs-Protokolls (engl. *staggered extension protocol*, *StEP*) für die PCR hervorging (Abbildung 5) [24]. Ein Gemisch aus Eltern-DNA wird bei StEP einem fortlaufenden Prozess aus schneller Primer-Anlagerung, einem kurzen Verlängerungsschritt und anschließender abrupter Denaturierung unterworfen. Durch die Reaktionsführung können die wachsenden DNA-Fragmente sich am „falschen“ Elternstrang anlagern und dessen Sequenz zur Verlängerung nutzen. Dieser auch als *mispriming* bezeichnete Vorgang kann aber nur in ausreichendem Maße erfolgen, sofern die eingesetzte Eltern-DNA eine hohe Sequenzhomologie aufweist. Außerdem sind beim StEP - wie beim DNA shuffling - ähnliche Nachteile die Rekombinationsreaktion betreffend zu erwarten.

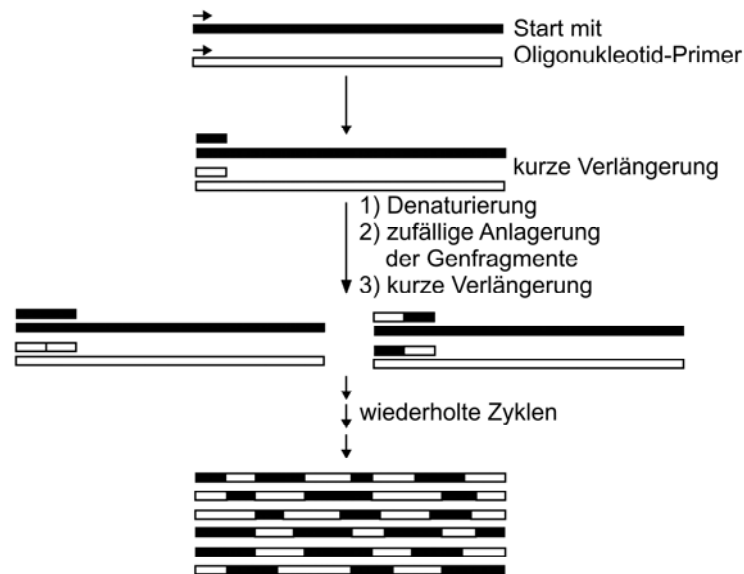


Abbildung 5. Schema der Erstellung von DNA-Bibliotheken mittels StEP. Auf eine kurze Verlängerung des Oligonukleotid-Primers folgt sofort eine Denaturierung der gebildeten doppelsträngigen DNA-Abschnitte. Die große Sequenzhomologie der Eltern-DNA bewirkt, dass die gebildeten Genfragmente sich auch am „falschen“ Templat anlagern können. Daraufhin erfolgt erneut ein kurzer Verlängerungsschritt, dem eine weitere Denaturierungsphase folgt. Wiederholte PCR-Zyklen bilden DNA-Sequenzen, in denen die Eltern-DNA miteinander vermischt ist. (nach [25])

1.2.4. Inkrementelle Verkürzung zur Schaffung von Hybridenzymen

Die Inkrementelle Verkürzung zur Schaffung von Hybridenzymen (engl. *Incremental Truncation for the Creation of Hybrid Enzymes, ITCHY*) [26, 27] ermöglichte schließlich die Bildung einer DNA-Bibliothek, die unabhängig von der Homologie der genutzten Sequenzen war. Die nachfolgende Beschreibung der Methode bezieht sich bereits auf ein verbessertes Protokoll, das als THIO-ITCHY [28] bezeichnet wird. Nukleotid-Triphosphat-Analoga (z. B. α -Phosphothionat-Nukleotide) werden zufällig in ein Gensegment, das aus zwei Genabschnitten besteht, die keine Sequenzhomologie besitzen müssen, eingebaut. Anschließend werden die PCR-Produkte mit Exonuklease III basenweise abgebaut, wobei der Verkürzungsprozess an den Nukleotid-Analoga abbricht. So kann eine Bibliothek unterschiedlich kurzer DNA-Fragmente mit jeweils verschiedener Gewichtung der ursprünglich eingesetzten Genabschnitte erhalten werden.

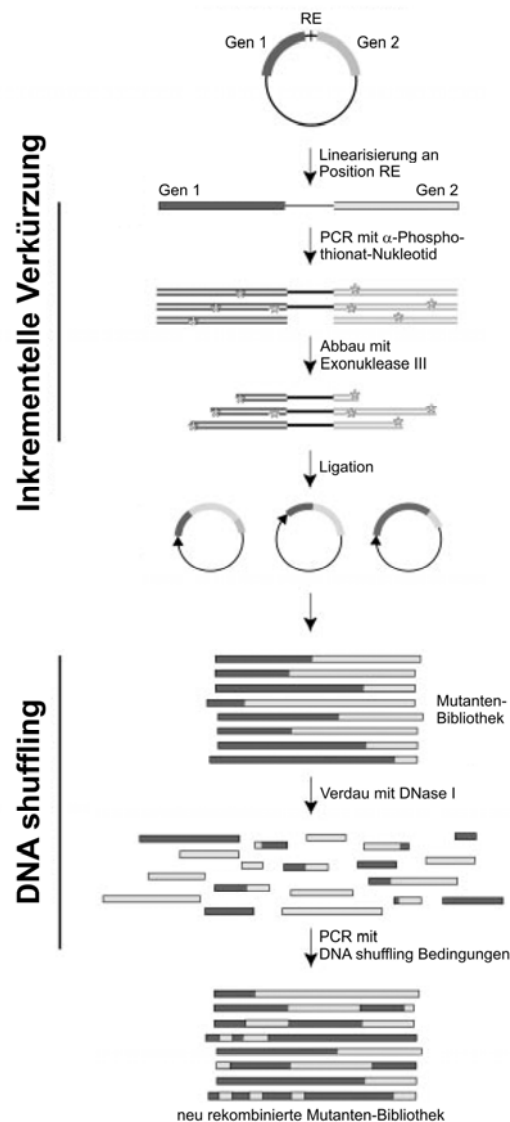


Abbildung 6. Schema der SCRATCHY-Methode, einer Kombination aus inkrementeller Verkürzung (THIO-ITCHY) und DNA shuffling. Diese Methode erlaubt zum ersten Mal die Kombination in ihrer DNA-Sequenz äußerst heterologer Gene in einer Mutanten Bibliothek. Die Mutanten entstehen durch Abbau der Gen-Sequenzen mit Exonuklease III bis zur Position der mittels PCR zufällig eingebauten Nukleotid-Triphosphat-Analoga. Dabei entstehen *blunt ends* über die die DNA-Sequenzen zu vollständigen Plasmiden religiert werden. Durch Verdau der neuen Plasmide entsteht die DNA-Bibliothek mit gleicher Länge aller Sequenzen aber unterschiedlicher Gewichtung der Elterngene. Anschließend durchgeführtes DNA shuffling erhöht die Rekombinationsrate. (nach [29])

Der Beschreibung der Methode kann leicht entnommen werden, dass der Hauptnachteil zu bereits genannten Methoden darin besteht, dass lediglich an der Verknüpfungsstelle ein Übergang zwischen den beiden Gensegmenten erfolgt, also kein hohes Maß an Rekombinationen auftritt. Eine Lösung stellt die Kombination aus ITCHY und DNA shuffling dar, die auch SCRATCHY genannt wird (Abbildung 6) [29].

1.2.5. DNA-Rekombination unabhängig von der Sequenzhomologie

Neben ITCHY ermöglichte die Protein Rekombination in Unabhängigkeit von der Sequenzhomologie (engl. *Sequence Homology-Independent Protein Recombination*, *SHIPREC*) auch zwei von einander unabhängige Sequenzen in einer Bibliothek zu vereinen (Abbildung 7) [30]. Die Durchführung von SHIPREC kann teilweise als Anwendung des DNA shuffling-Protokolls begriffen werden. Zuerst wird das Ligationsprodukt aus den beiden Gensequenzen mit DNase I in unterschiedlich große Fragmente verdaut und durch Behandlung mit Nuklease S₁ *blunt ends* erzeugt. Nach einer Größenseparierung durch ein Gel werden die beiden Enden zu einem zirkulären Plasmid ligiert. Linearisierung dieser Plasmide liefert eine Bibliothek mit Hybrid-Genabschnitten, die alle dieselbe Größe besitzen aber eine unterschiedliche Verteilung der beiden Gensequenzen aufweisen.

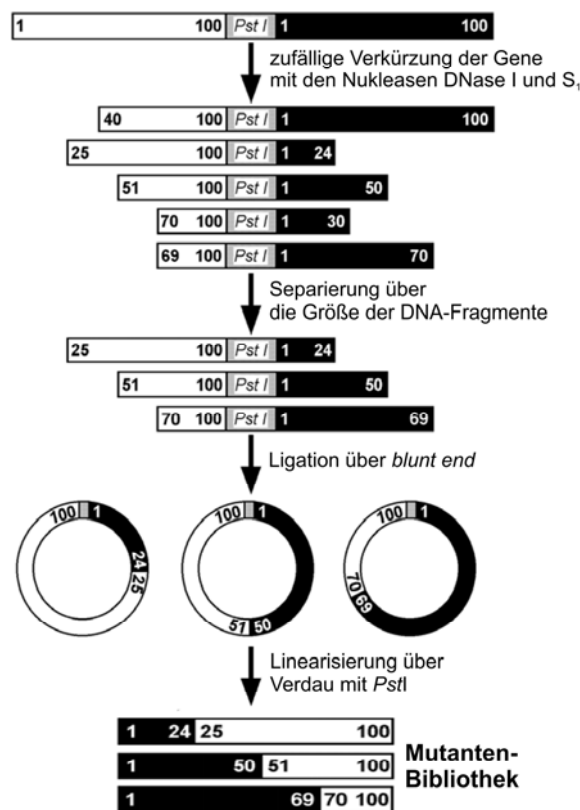


Abbildung 7. Aufbau von Mutanten-Bibliotheken heterologer Gene mittels der Methode SHIPREC. Nach dem zufälligen Abbau des DNA-Segementes durch die Nukleasen DNase I und S₁, werden die erhaltenen DNA-Fragmente über ihre Größe selektiert und zu einem zirkulären Plasmid ligiert. Abschließend erfolgt eine Linearisierung über einen Verdau mit z. B. *PstI* durch einen Schnitt im Plasmid-Rückgrat. Die erhaltene Bibliothek lässt sich nun in das gewünschte Plasmid klonieren. (nach [30])

Analog zu ITCHY besitzt die durch SHIPREC aufgebaute Bibliothek auch nur die Rekombination der beiden Gensequenzen an der Verbindungsstelle.

1.2.6. Technologie zum Austausch und Herausschneiden von Nukleotiden

Als eine der neusten Entwicklungen soll abschließend die Technologie zum Austausch und Herausschneiden von Nukleotiden (engl. *Nucleotide Exchange and Excision Technology*, *NExT*) erläutert werden (Abbildung 8) [31]. NExT startet mit einer PCR in der Thymidin gegen Uridin ausgetauscht wird. Die Uridin-Base bildet das Angriffsziel der nachfolgenden Behandlung mit der Uracil-DNA-Glykosilase. Die bei der Uracil-Entfernung entstehenden Lücken werden genutzt, um mit Piperidin oder Natronlauge Strangbrüche herbeizuführen. Die Länge der erhaltenen Fragmente wird maßgeblich durch das Verhältnis von dUTP zu dTTP bestimmt. Zuletzt werden die Fragmente analog zum DNA shuffling in einer PCR miteinander zu einem Produkt bestimmter Länge kombiniert.

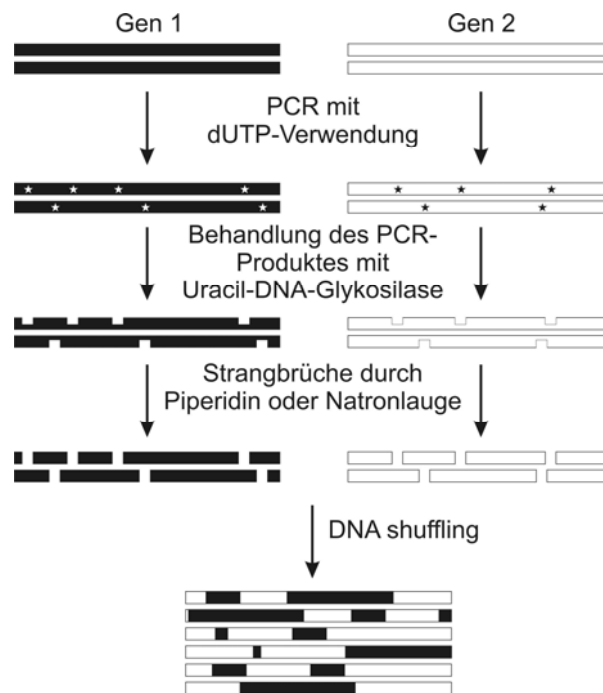


Abbildung 8. Schematische Darstellung der Methode NExT. Aus einem PCR-Produkt, das unter Verwendung eines dUTP/dTTP-Gemisches hergestellt wurde, schneidet die Uracil-DNA-Glykosilase die Base Uridin heraus. Das dabei intakt bleibende Zucker-Rückgrat der DNA kann durch Behandlung mit Piperidin oder Natronlauge an den Stellen des Uracils zerbrochen werden. Abschließend werden die erhaltenen DNA-Fragmente einer DNA shuffling-PCR zugeführt.

Als Vorteile sind zu nennen, dass die Fragmentgröße in Abhängigkeit vom dUTP/dTTP-Verhältnis reproduzierbar sei, daher ein Gel entfallen könne und eine Aufreinigung der Fragmente über Silica-Membranen ausreiche. Weiterhin sei die Effizienz der Rekombination auch von kleinen Fragmenten während der zweiten PCR sehr hoch und schließlich seien fast keine Verunreinigungen der Bibliothek durch Klone, die aus nicht rekombinierter DNA hervorgegangen seien, zu beobachten.

1.3. Präsentationsmethoden - Die Verbindung zwischen Geno- und Phänotyp

Nachdem die DNA-Bibliothek gemäß z. B. einer der vorstehend genannten Methoden erzeugt wurde, ist es sowohl bei *in vivo* als auch bei *in vitro* Anwendungen notwendig die entsprechend veränderten Gene zu exprimieren. Trotzdem muss eine Verknüpfung zwischen der DNA (Genotyp) und dem Protein (Phänotyp) methodisch gewährleistet werden, die gegenüber den angewandten Selektionsbedingungen stabil ist. In jener Hinsicht sind die unterschiedlichsten Ansätze zur Lösung des Problems entwickelt worden, von denen einige nachfolgend vorgestellt werden.

1.3.1. *In vitro* Kompartimentierung

Vollständig *in vitro* ablaufende Expressions- und Selektionsverfahren bilden mehr als 10^{14} individuelle Proteinvarianten [32]. Die auf dem Gebiet der *in vitro* Selektionsverfahren am häufigsten genutzten Methoden sollen in den folgenden Kapiteln näher beleuchtet werden.

Die *in vitro* Kompartimentierung nutzt einen rudimentären Nachbau einer Zelle im Labor, wobei jeweils eine Gensequenz der DNA-Bibliothek in ein kleinstes Tröpfchen einer Wasser-in-Öl-Emulsion ($>10^{10}$ Kompartimente pro mL Emulsion) eingeschlossen wird (Abbildung 9a)) [33]. Die Nutzung von zellfreier Transkription und/oder Translation liefert die zugehörige RNA bzw. das Protein. Die anschließende Umsetzung eines Substrates durch die katalytische RNA bzw. das Protein führt zur Modifikation der im Kompartiment vorliegenden DNA, auf die nach dem Aufbrechen der Wassertröpfchen isoliert werden kann. Um das Problem der Notwendigkeit der Modifikation der DNA durch die RNA oder das Protein zu umgehen, wurden Streptavidin-modifizierte Mikrokügelchen (engl. *microbeads*) eingesetzt (Abbildung 9b)) [34]. Die *microbeads* präsentieren auf ihrer Oberfläche neben der über Biotin gebundenen DNA-Sequenz noch Antikörper gegen eine kurze Peptidsequenz (engl. *tag*), die mit dem Protein exprimiert wird. Das Aufbrechen der Wassertröpfchen resultiert in der Gewinnung der *microbeads*, an die sowohl die DNA-Information als auch das zugehörige Protein gebunden ist. Der Einsatz von Fluoreszenz-markierten Antikörpern gegen die immobilisierten Proteine bzw. das immobilisierte, umgesetzte Substrat oder eine Substrat-Umsetzung mit Fluoreszenzgenerierung ermöglicht den Einsatz der Methode der fluoreszenzaktivierten Zellsortierung (engl. *fluorescence activated cell sorting, FACS*), um die gewünschten

Proteine zu isolieren. In den ersten beiden Fällen werden durch die Antikörper markierte microbeads [35], bei der letzten Möglichkeit fluoreszierende Wassertropfchen abgetrennt [36, 37].

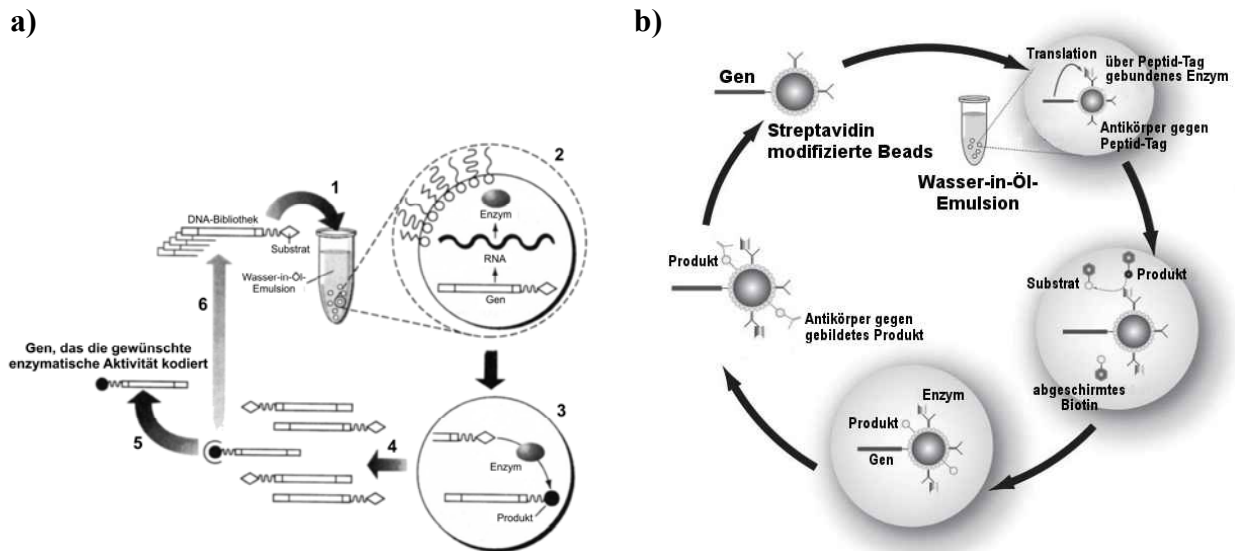


Abbildung 9. Schematische Darstellung der *in vitro* Kompartimentierung zur Untersuchung von DNA-Bibliotheken. a) Basierend auf den Gensequenzen der DNA-Bibliothek, die mit einem Substrat für ihr Genprodukt verbunden sind (1), werden in den Mikrotröpfchen der Wasser-in-Öl-Emulsion Proteine zellfrei translatiert (2). Die gebildeten Enzyme wandeln das Substrat- in ein Produktmolekül um (3). Durch Aufbrechen der Mikrotröpfchen werden neben den DNA-Molekülen mit nicht umgesetztem Substrat auch diejenigen mit gebildetem Produkt freigesetzt (4). Schließlich kann über das Produkt nach den „richtigen“ Gensequenzen gefischt werden (5) und mit ihnen eine neue DNA-Bibliothek aufgebaut werden (6). b) In einer moderneren Variante ist die DNA-Sequenz über Bindung an Streptavidin modifizierte microbeads immobilisiert. Durch Translation in den Mikrotröpfchen entstehen Enzyme, die einen Peptid-Tag besitzen, über den sie via immobilisierte Antikörper gegen den Tag gebunden werden. Die Enzyme werden genutzt, um eine Biotin-Substrat-Fusion in eine Biotin-Produkt-Fusion umzuwandeln. Über das Biotin wird das gebildete Substrat an die Beads gebunden. Nach dem Aufbrechen der Mikrotröpfchen kann das Produkt mittels Antikörper/Fluoreszenzfarbstoff-Konjugate detektiert werden. (nach [32, 33])

Die *in vitro* Kompartimentierung bietet einige Vorteile, z. B. können experimentelle Randbedingungen, wie die Temperatur [38, 39] oder der pH-Wert [35], schnell verändert werden, die Versorgung der Kompartimente mit hydrophoben Substraten und Liganden kann durch die organische Phase leicht ermöglicht werden [35], aber auch der Transport von wasserlöslichen Komponenten musste durch die Vereinigung eines Wassertropfens mit einem Nanotropfen bzw. einer Mizelle nicht ausgeschlossen werden [40, 41] und schließlich können durch zellfreie Methoden auch Proteine genutzt werden, die für lebende Zellen toxisch sind. Das geringe Volumen von ca. 5 Femtoliter bewirkt, dass sich in einem Kompartiment mit $>10^4$ Enzymen eine sehr hohe Konzentration an katalytisch aktivem Protein einstellt, die eine Analyse des Selektionsprozesses auch bei schlechten Signal-zu-Rausch-Verhältnissen gestattet [42].

1.3.2. Präsentation auf dem Ribosom

Im Jahre 1994 stellte die Gruppe um Dower zum ersten Mal die als Ribosomen-Display (engl. *ribosome display*) bezeichnete Methode der Präsentation von Proteinen auf dem Ribosom vor (Abbildung 10) [43]. Das Ribosomen-Display wurde schließlich in der Arbeitsgruppe Plückthun zu einer Standard-*in vitro*-Evolutionemethode weiterentwickelt [44]. Die Methode nutzt die Tatsache, dass der sich im Zustand der Translation befindende Komplex, d. h. Ribosom, mRNA und Polypeptidkette, stabil ist und nicht auseinanderdissoziiert, sofern kein Stoppsignal auf der mRNA vorkommt. Daher liegt in diesem Fall über das Ribosom eine nicht-kovalente Bindung zwischen der mRNA („Genotyp“) und der Polypeptidkette, die nun Zeit hat sich zum Protein („Phänotyp“) zu falten, vor. Nach Selektion und Elution kann der ternäre, ribosomale Komplex z. B. durch Erwärmen leicht zerstört werden und die freigesetzte mRNA mit reverser Transkription in die entsprechende DNA umgeschrieben werden.

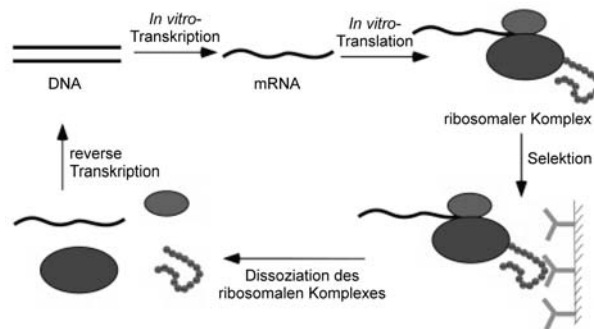


Abbildung 10. Schematischer Ablauf des Ribosomen-Displays. Nach *in vitro*-Transkription der DNA-Sequenz entsteht bei der *in vitro*-Translation der ribosomale Komplex, der aufgrund der Abwesenheit eines Stopkodons auf der mRNA nicht auseinander dissoziiert und während der Selektion über die gebildete Polypeptid-Kette stabil gehalten werden muss. Die selektierten ribosomalen Komplexe werden z. B. durch Erwärmen in ihre Bestandteile zerlegt und aus der mRNA mittels reverser Transkription erneut die DNA-Sequenz gebildet. (nach [45])

Bei der Durchführung des Ribosomen-Displays müssen evtl. einige Limitationen beachtet werden. Zum einen ist der ternäre Komplex aus mRNA, Ribosom und Polypeptidkette äußerst instabil, welches leicht zum Verlust der Verbindung zwischen Geno- und Phänotyp führt, zum anderen konnte gezeigt werden, dass die Ausbeute an gebildetem, stabilem Komplex sehr entscheidend vom translatierten Protein abhängt und lediglich 0,2% bis 27% der eingesetzten mRNA-Moleküle in einem ribosomalen Komplex gebunden vorliegen [44].

1.3.3. mRNA-Peptid-Fusionstechnologie

Die Schwierigkeit der Aufrechterhaltung des ternären, ribosomalen Komplexes unter den Selektionsbedingungen beim Ribosomen-Display, führte zwei Arbeitsgruppen unabhängig voneinander zur Entwicklung von mRNA-Peptid-Fusionen (engl. *mRNA display*), die eine kovalente Verbindung zwischen der mRNA und der Polypeptidkette besaßen (Abbildung 11) [46, 47].

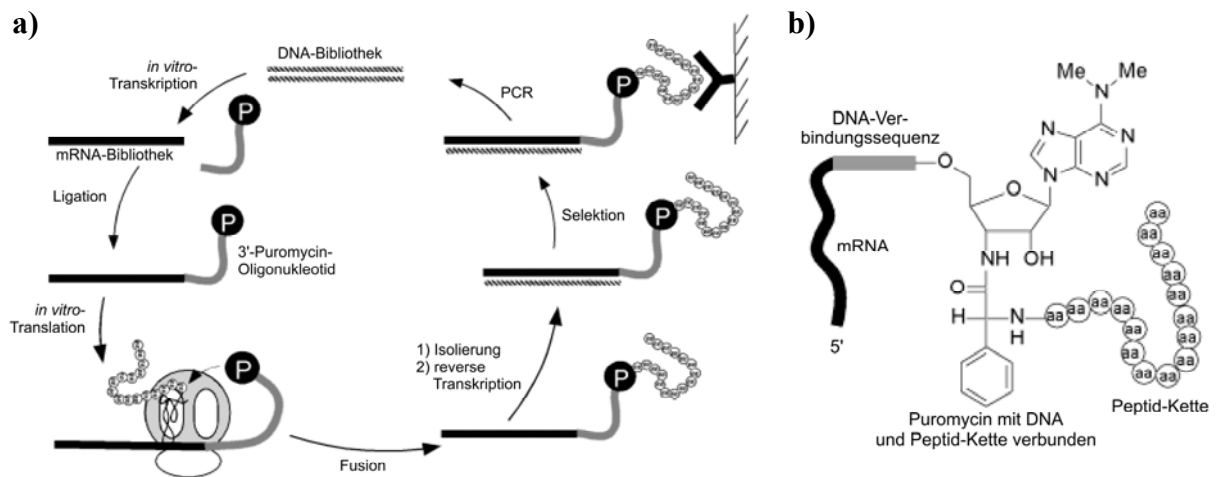


Abbildung 11. Selektion von DNA-Bibliotheken mit Hilfe von mRNA-Peptid-Fusionen. a) Nach der *in vitro*-Transkription der DNA-Bibliothek wird die entstandene mRNA-Bibliothek über eine Reaktion mit Psoralen mit einem 3'-Puromycin-Oligonukleotid verknüpft. Während der *in vitro*-Translation stoppt das Ribosom an der mRNA/DNA-Übergangsstelle, so dass das Aminoacyl-tRNA-Analogon Puromycin eine Bindung mit dem C-Terminus der Polypeptid-Kette bilden kann. Hierbei entsteht der in b) gezeigte Komplex aus mRNA, Puromycin und der Peptidkette. Nach der Isolierung des Komplexes wird die mRNA in DNA revers transkribiert (Die reverse Transkription kann auch nach der Selektion erfolgen). Auf die anschließende Selektion folgt eine PCR, um doppelsträngige DNA zu erhalten, die in einer neuen Bibliothek genutzt werden kann. (nach [45])

Zuerst muss die transkribierte mRNA-Bibliothek mit einem 3'-Puromycin-Oligonukleotid über eine licht-induzierte Reaktion mit Psoralen kovalent verbunden werden [48]. An dieser Verbindungsstelle stoppt das Ribosom während des darauffolgenden zellfreien Translationsprozesses und ermöglicht dem Puromycin, einem Aminoacyl-tRNA-Analogon, die A-Position des Ribosomes einzunehmen. Hier kann es eine kovalente Verknüpfung mit der Polypeptidkette eingehen, woraufhin die Translation abbricht und die mRNA-Peptid-Fusion durch Zerstörung des ribosomalen Komplexes befreit wird. Die Durchführung der reversen Transkription der mRNA zu DNA kann sowohl vor als auch nach dem nun anstehenden Selektionsschritt erfolgen.

Die Ausbeute an mRNA-Peptid-Fusionen konnte von anfänglich 0,7% auf 40% der eingesetzten mRNA-Moleküle gesteigert werden. Bei einigen Proteinen kann die reine *in vitro* Durchführung des mRNA display einen Nachteil bedeuten, sofern sie Bestandteil der Zell-

membran sind oder eine posttranslationale Modifikation erfahren, weil jene Bedingungen nicht nachgebildet werden können.

1.3.4. Präsentation auf der Zelloberfläche

Nach den reinen *in vitro*-Methoden sollen nun Verfahren vorgestellt werden, die zumindest teilweise den Einsatz der zellulären Maschinerie nutzen. Zwar sind die Bibliotheksgrößen durch Transformations- bzw. Transfektionsraten begrenzt, jedoch ist hierbei die Verbindung zwischen Geno- und Phänotyp im Labor leichter zu Hand haben.

Zu Anfang soll die Präsentation von Proteinen auf der Zelloberfläche (engl. *cell-surface display*) erläutert werden (Abbildung 12). In dieser Anwendung bildet die Zelle selbst das Verbindungsglied zwischen Geno- und Phänotyp. Die Oberfläche kann sowohl von Bakterien- (engl. *bacterial display*) [49, 50], Hefe- (engl. *yeast display*) [51] als auch Säugerzellen (engl. *mammalian cell display*) [52, 53] stammen. In der Regel wird die DNA-Bibliothek an ein Gen für ein Membranlokalisierungsprotein fusioniert. Bei Bakterienzellen wird z. B. ein Hybrid aus einem Lipoprotein und den Aminosäuren 46-159 des äußeren Membranproteins A (Lpp-OmpA) [49] genutzt und bei Hefezellen der Zelloberflächen-Rezeptor α -Agglutinin [51]. Zur Analyse der Protein-Bibliothek wird häufig die Umsetzung eines Substrates unter Generierung einer Fluoreszenzfarbstoffmarkierung mit anschließender Nutzung der FACS-Methode angewandt. Die so stattfindende Markierung mit dem Fluoreszenzfarbstoff kann sowohl auf einer Verknüpfung mit dem präsentierten Protein als auch auf ionischen Wechselwirkungen zwischen dem umgesetzten Substrat und der Zellmembran basieren.

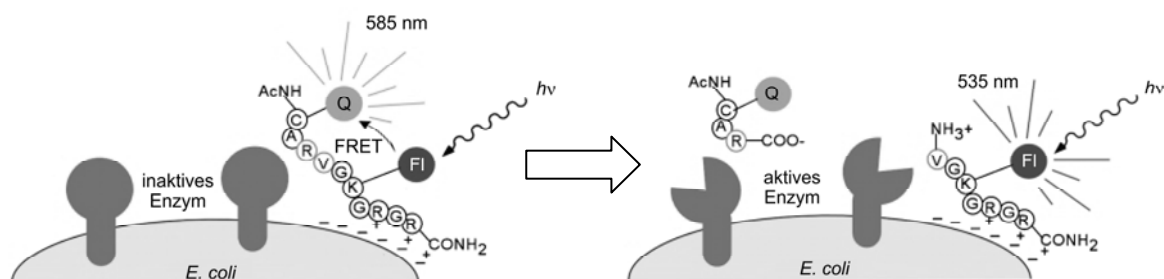


Abbildung 12. Schematische Darstellung des Prinzips der Präsentation auf der Zelloberfläche. Exemplarisch ist die Präsentation von Proteasen auf der Zelloberfläche des Bakteriums *E. coli* gezeigt. Sobald die Proteasen aktiv sind wird das FRET-Paar (engl. *fluorescence resonance energy transfer*) aus dem Fluorophor (FI) und dem löschenden Fluorophor (Q) durch Zerteilen der Peptid-Kette aufgehoben und die Fluoreszenz-Emission kann bei 535 nm detektiert werden. (nach [45])

Ursprünglich diente die Präsentation von Proteinen auf der Oberfläche von Bakterien zur Gewinnung von Lebendimpfstoffen [54]. Jedoch musste schnell festgestellt werden, dass eukaryotische Proteine, insbesondere Antikörper und T-Zellrezeptoren aus Säugern, nicht oder überwiegend fehlgefaltet vorlagen [55]. Einen Weg dieses Problem zu umgehen, stellte die Nutzung der Oberfläche von Hefezellen dar, da in Hefen ein eukaryotischer Proteinfaltungsapparat vorhanden ist und die Kodon-Nutzung derjenigen in Säugerzellen sehr ähnelt [56].

Die Präsentation von Proteinen auf der Oberfläche von Säugerzellen ist schwieriger, kann aber unter Ausnutzung der Signaltransduktionswege in Säugerzellen zu einer besseren Selektion führen. Die Arbeitsgruppe Borrebaeck stellte 2004 unter der Bezeichnung SPIRE (*selection of protein interactions based on receptor engagement*) eine Methode zur Nutzung von Säugerzellen vor (Abbildung 13) [52].

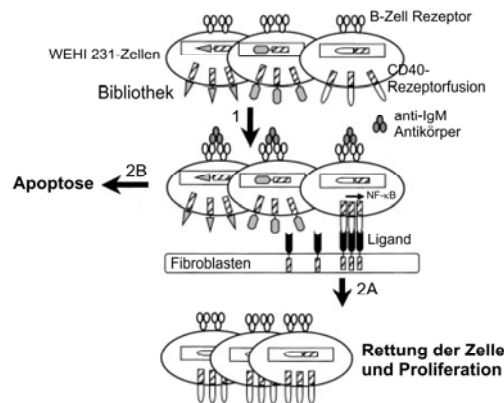


Abbildung 13. Schematische Vorgehensweise bei der Verwendung von SPIRE. Transfizierte WEHI 231-Zellen präsentieren die Bibliothek als Fusion mit der cytoplasmatischen Domäne des CD40-Rezeptors (1). Durch Bindung eines anti-IgM Antikörpers an den B-Zell Rezeptor wird die Apoptose eingeleitet (2B). Nur die Aggregation des CD40-Rezeptors über Bindung der Bibliothek an einen immobilisierten Liganden kann den Transkriptionsfaktor NF-κB aktivieren und dadurch die Zelle retten (2A). (nach [52])

Das präsentierte Protein ist extrazellulär an die Domäne des CD40-Rezeptors fusioniert. Zugabe von anti-IgM Antikörpern bewirkt die Einleitung des programmierten Zelltodes (Apoptose). Dem entgegen wirkt die Aggregation und Aktivierung des CD40-Rezeptors, die durch eine Interaktion zwischen einem immobilisierten Liganden und der Protein-Bibliothek entsteht. Das Ablaufen des angestoßenen Signaltransduktionsweges bewirkt schließlich eine Aktivierung der mitogen-aktivierten Proteinkinase [57], in deren Konsequenz die Zelle überlebt und sich teilen kann.

1.3.5. Präsentation auf der Oberfläche eines Bakteriophagen

Die älteste und am weitesten verbreitete sowie am häufigsten genutzte Methode ist die 1985 von Smith vorgestellte und als Phagen-Display (engl. *phage display*) bezeichnete Präsentation des Proteins als Fusion mit einem Hüllprotein eines filamentösen Bakteriophagen der Ff-Familie [58]. Den Genotyp bildet das molekularbiologisch veränderte, einzelsträngige Phagenom, das durch diverse Hüllproteine umhüllt wird. Andererseits stellen die einkapselnden Hüllproteine den Phänotyp dar, da einige von ihnen als Fusion mit dem zu präsentierenden Protein in den Phagenpartikel eingebaut werden.

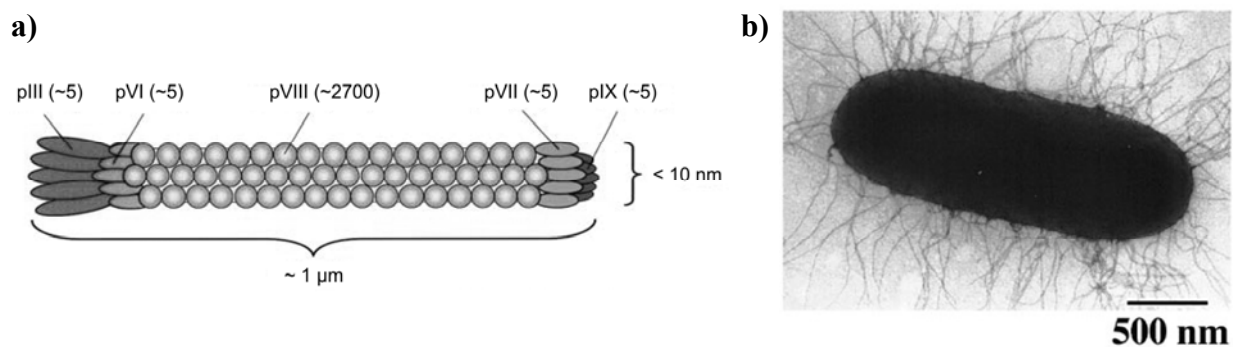


Abbildung 14. Schematische Darstellung des Aufbaus des M13-Bakteriophagen und Aufnahme einer Bakterienzelle, die infiziert wird. a) Der M13-Bakteriophage besteht aus den Hüllproteinen pIII, pVI, pVII, pVIII und pIX (in Klammern ist die relative Häufigkeit angegeben), die das Phagenom als einzelsträngige DNA umschließen. b) Mikroskopische Aufnahme einer *E. coli*-Zelle, die von unzähligen Phagen infiziert wird. (nach [59])

Die filamentösen Bakterienphagen der Ff-Familie infizieren als Viren gram-negative Bakterien (im Labor meistens *E. coli*) und besitzen eine Länge von ca. 1 µm sowie eine Breite von weniger als 10 nm [60]. Sie können in drei Klassen, nämlich die f1-, fd- und M13-Phagen, unterteilt werden, die eine sehr hohe Sequenzhomologie (> 98%) aufweisen [61]. Die Hülle der Phagenpartikel besteht aus fünf Hüllproteinen, die das einzelsträngige Phagenom umschließen. Der größte Teil der Phagenoberfläche wird durch das Hüllprotein VIII (pVIII) gebildet, das mit ca. 2700 Kopien in einer rechtsgängigen, helikalen Anordnung die Seitenwand des Partikels aufbaut, wobei einzelne pVIII miteinander in der Art von Fischschuppen überlappen [60]. Die Spitze des Phagenpartikels wird durch je 5 Kopien der Hüllproteine VII (pVII) und IX (pIX) verschlossen. Das gegenüberliegende Ende besteht aus je 5 Kopien der Hüllproteine III (pIII) und VI (pVI). Aufgrund der hohen sequentiellen Homologie können Hüllproteine einzelner Klassen der Ff-Phagen leicht und ohne negative Auswirkungen gegeneinander ausgetauscht werden. Neben den Hüllproteinen kodiert das Phagenom für weitere Proteine, nämlich das pI, pII, pIV, pV, pX und pXI, die für die Aufgaben

der Replikation des Phagenoms unter Ausnutzung der Maschinerie des Wirtsbakteriums (pII, pV und pX) und des Zusammenbaus des Phagenpartikels sowie der anschließenden Sekretion (pI, pIV und pXI) verantwortlich sind [61].

Die filamentösen Bakteriophagen können ausschließlich „männliche“ Bakterien infizieren, d. h. Zellen die einen für die Konjugation benötigten F-Pilus ausbilden. Die darauffolgende Produktion der Phagenpartikel durch das infizierte Bakterium geschieht im Gegensatz zum lytischen T7-Bakteriophagen in einem nicht-lytischen Prozess, d. h. die Zelle produziert auf Kosten ihres eigenen Metabolismus hauptsächlich Phagen, stirbt aber durch die Phagenproduktion und anschließende Freisetzung nicht.

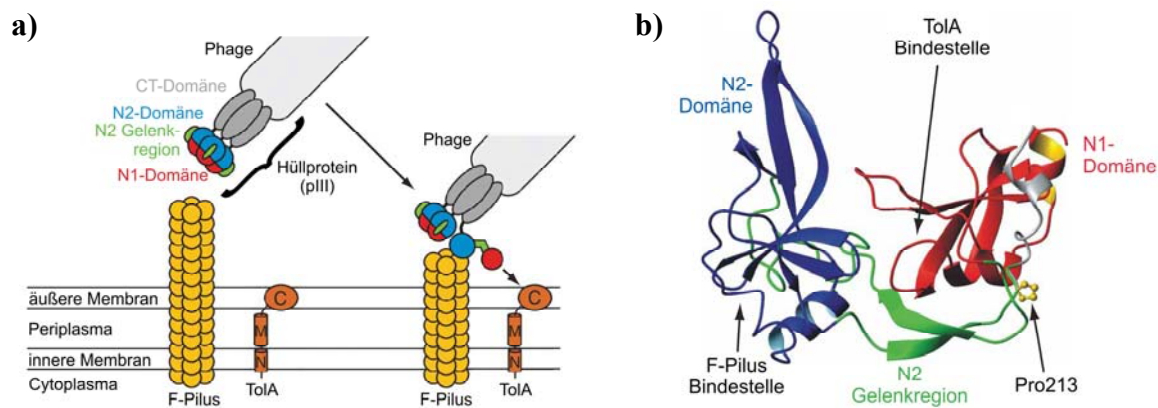


Abbildung 15. Funktion des pIII in der Bakterieninfektion durch Phagen. a) Durch Bindung der N2-Domäne des pIII an den F-Pilus des Bakteriums verändert Pro213 seine Konformation von *cis* nach *trans*. Hierdurch interagiert die N1-Domäne mit dem TolA-Rezeptor, sodass als Folge davon auf einem bisher unbekannten Weg das Phagenom in das Bakterium eingeschleust wird. b) Kristallstruktur der N1- (rot) und N2-Domäne (blau) des pIII mit der verbindenden Gelenkregion (grün) (PDB: 2G3P, [62]). Neben dem Pro213 sind auch die F-Pilus- und TolA Bindestellen eingezeichnet. (nach [63])

Für die Infektion der Bakterien steht dem Phagen ausschließlich das pIII zur Verfügung, das aus drei Domänen besteht. Die C-terminale Domäne (CT-Domäne) ist im Phagenpartikel verankert und scheint nach bisheriger Forschung nicht in den Infektionsvorgang involviert zu sein. In Richtung N-Terminus schließt sich eine Serin/Glycin-reiche Verbindungssequenz zur 2. N-terminalen Domäne (N2-Domäne) an. Durch eine zweite ebenfalls Serin/Glycin-reiche Verbindungssequenz, die N2-Gelenkregion, ist von der N2-Domäne die 1. N-terminale Domäne (N1-Domäne) getrennt (Abbildung 15b)). Während des Infektionsprozesses dockt die N2-Domäne an den F-Pilus an [64, 65] und löst dadurch mehrere Folgereaktionen aus (Abbildung 15a)). Zum einen beginnt der F-Pilus sich zurückzuziehen und führt dadurch den Phagen immer näher an die äußere Zellmembran heran. Zum anderen führt die Anlagerung der N2-Domäne zu ihrer eigenen Destabilisierung, die durch das Absinken der Schmelztemperatur von 48°C im Komplex mit der N1-Domäne auf 35 bis 40°C charakterisiert ist [66].

Als Folge daraus kann die Bindung zwischen Gln212 und Pro213 in der Gelenkregion zwischen N1- und N2-Domäne aus der *cis*- in die *trans*-Konformation isomerisieren [63]. Daraufhin wird die N1-Domäne aus dem Komplex mit der N2-Domäne so herausgelöst, dass die vorher verborgene Bindungsstelle zur C-terminalen Domäne des TolA-Rezeptors nun offen liegt und mit dem Rezeptor eine Bindung eingeht [67-69]. Als Zeitschaltuhr für die destabilisierte, infektiöse Konformation des pIII dient die *trans*-zu-*cis* Rückisomerisierung des Pro213 mit einer Halbwertszeit von 6200 s bei 25°C [70].

Beim Phagen-Display (Abbildung 16) wird die DNA Bibliothek als *in frame* Gensequenz an das 5' (N-terminale Fusion auf Proteinebene) oder das 3' Ende (C-terminale Fusion) eines Hüllprotein-kodierenden Gens kloniert. Mit dem entstandenen Gemisch unterschiedlicher Phagen Genome werden anschließend *E. coli*-Zellen transformiert. Sofern es sterisch möglich ist, wird als Folge daraus jede Kopie des angesprochenen Hüllproteins als Hybrid mit dem durch die DNA-Bibliothek kodierten Protein vom Bakterium exprimiert und in die gebildeten Phagenpartikel eingebaut. Die somit auf der Oberfläche des Phagen präsentierten Proteine werden daraufhin auf eine gewünschte Eigenschaft untersucht. Hierbei wird häufig die Wechselwirkung mit einem Zielprotein oder -peptid ausgenutzt. Jedoch wurden auch schon die Bindung von Übergangszustands-Analoga [71-75] oder Inhibitoren [76-82] sowie die Umsetzung von Substraten [83-88] erfolgreich zur Selektion auf gewünschte Proteineigenschaften eingesetzt. Phagenpartikel die hingegen den „falschen“ Phänotyp aufweisen, werden in der Regel durch intensive Waschprozesse entfernt. Die verbleibenden Phagen können nach der Selektion erneut Wirtszellen infizieren oder das einzelsträngige Phagen Genom kann aus den Partikeln gewonnen werden, um es durch Anwendung der Methoden aus Kapitel 1.1. und 1.2. neuer Mutagenese zu unterziehen. Besonders positiv wirkt sich während des Selektions- und Anreicherungsprozesses die hohe Stabilität der Phagenpartikel aus. Sowohl hohe Salzkonzentrationen [89], hohe [90] und niedrige pH-Werte [58, 91-94] als auch reduzierende [95-97] bzw. denaturierende Reagenzien [98] wirkten sich nicht negativ auf die Infektiosität der Phagen aus. Die Durchführung des gesamten vorstehend beschriebenen Prozesses wird als Absolvierung einer *biopanning*-Runde bezeichnet.

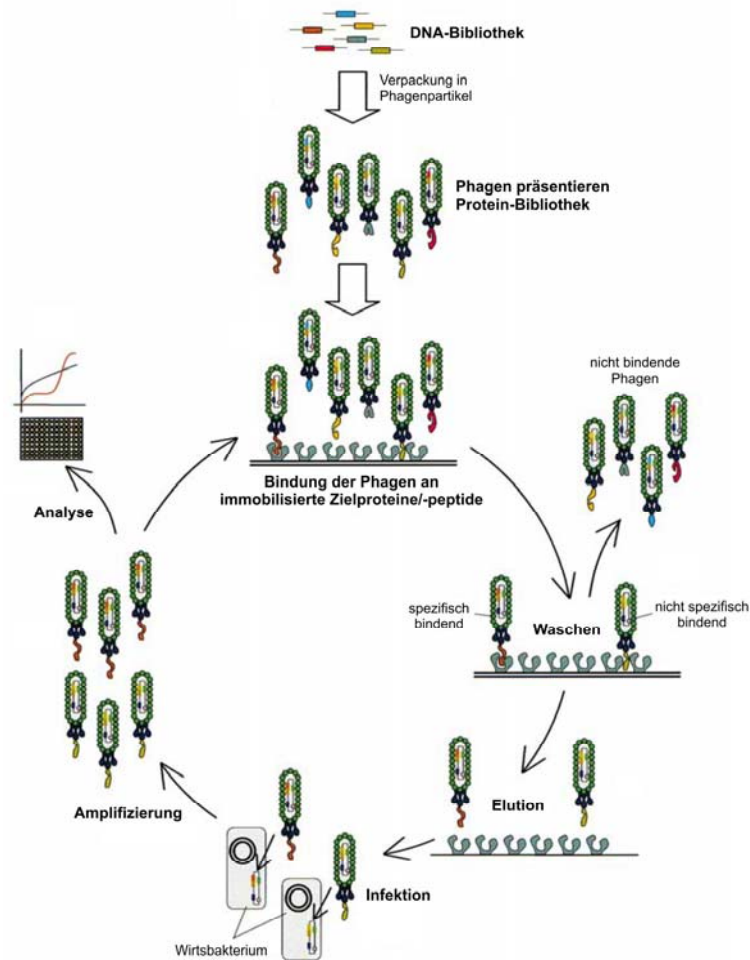


Abbildung 16. Schematischer Ablauf eines Biopanningzyklus. Nachdem *E. coli*-Zellen mit der DNA-Bibliothek transformiert und Phagenpartikel gebildet wurden, wird die exprimierte Fusionsprotein-Bibliothek auf ihre Interaktion mit einem immobilisierten Bindungspartner getestet. Durch den anschließenden Waschvorgang werden nicht bindende Phagen entfernt und nur gebundene Phagen eluiert. Zur Amplifizierung der eluierten Phagen werden Bakterien mit ihnen infiziert. Die entstehenden Phagenpartikel können entweder analysiert oder erneut auf ihre Bindungseigenschaften getestet werden. (nach [59])

Für das Phagen-Display wurden inzwischen Hybride mit allen Hüllproteinen des Phagenpartikel in der Literatur vorgestellt [61]. Hierbei hängt die Position der Fusion mit dem Hüllprotein ausschließlich von dem Hüllprotein selbst ab. N-terminale Fusionen sind bevorzugt und wurden berichtet für pIII [58], pVII [99], pVIII [100] und pIX [99]. C-terminal zum Hüllprotein präsentierte Peptide sind bekannt für pVI [101], pVIII [102] und unter Zuhilfenahme des Fos/Jun Leucin-Reißverschluss-Systems (engl. *leucine zipper*) auch für pIII [103]. Um diese Aufzählung zu komplettieren, sei noch erwähnt, dass die DNA für das gewünschte Protein auch schon zwischen die CT- und die N2-Domäne des pIII kloniert wurde [104]. Somit zeigt sich, dass eine Vielzahl von Hybriden mit den unterschiedlichen Phagen-Hüllproteinen erstellt wurden, jedoch mit Abstand am meisten das pIII und pVIII genutzt wurden, weshalb die weiteren Erklärungen und Beschreibungen des Phagen-Display diese fokussieren.

Durch die Art der Proteinpräsentation und der Integration der Gensequenz werden drei Phagen-Display-Typen unterschieden, die sowohl auf pIII als auch auf pVIII angewandt wurden (Abbildung 17). Typ 3 [105, 106] bzw. Typ 8 [100] meint, wie im Abschnitt über das *biopanning* beschrieben, dass die DNA-Bibliothek direkt in das vollständige Phagengenom integriert wird. Da hierdurch alle Kopien des jeweiligen Hüllproteins als Hybride auftreten wird die Methode auch als polyvalentes Phagen-Display (engl. *polyvalent phage display*) bezeichnet. Das Vorkommen aller Hüllproteine einer Art als Hybride bringt aber einige Nachteile mit sich. Für Typ 8 bedeutet es, dass sterisch anspruchsvollere Peptide (von Proteinen abgesehen) nicht auf der Phagenoberfläche präsentiert werden können, sondern nur Peptidsequenzen, die aus 8 bis 10 Aminosäuren bestehen. Beim Phagen-Display des Typ 3 spielt neben den sterischen Problemen vor allem die verminderte bis nicht vorhandene Infektiosität der pIII-Hybride eine große Rolle. Daher wurden unabhängig voneinander zwei weitere Typen des Phagen-Display entwickelt. Unter der Bezeichnung Typ 33 [107] bzw. Typ 88 [108] werden Phagenpartikel gebildet die ein Gemisch aus natürlichen (Wildtyp) und Hybrid-Hüllproteinen aufweisen. Um dies zu erreichen wird zusätzlich zu der vorhandenen Gensequenz des Hüllproteins diejenige des Hybridproteins in das Phagengenom kloniert. Bei der Bildung des Phagenpartikels werden nun in der Regel natürliche Hüllproteine aber hin und wieder auch das Hybrid eingebaut. Hiermit wurden die Probleme des Phagen-Display der Typen 3 und 8 zwar weitestgehend ausgeschaltet, jedoch kam es durch die zugenommene Größe der DNA-Sequenz zu schlechten Transformationsraten und damit einhergehenden Beschränkungen der verwendeten DNA-Bibliothek. Abhilfe in jener Hinsicht brachte die Entdeckung des monovalenten Phagen-Display (engl. *monovalent phage display*) durch die Arbeitsgruppe Wells [102]. Diese Art des Phagen-Display wird auch als Typ 3+3 [109] bzw. 8+8 [110] bezeichnet, da neben dem Plasmid-kodierten Gen des Hüllproteins (Phagemid) auch ein molekularbiologisch veränderter, natürlicher Bakteriophage, ein sogenannter Helferphage, notwendig ist. Auf dem Phagemid ist neben dem Hüllgen, am 5'-Ende die Sequenz einer Signalpeptidase eines bakteriellen Zellsekretionsapparates, eine Antibiotika-Resistenz, um erfolgreich transformierte *E. coli*-Zellen zu identifizieren und abschließend je ein Replikationsursprung (engl. *origin of replication*, ori) für Bakterien (colE1 ori) und Ff-Bakteriophagen (Ff ori) zu finden. Zum Zwecke der Präsentation auf der Phagenoberfläche wird die DNA-Bibliothek *in frame* zwischen die Signalpeptidasesequenz und diejenige des Hüllproteins eingeführt. *E. coli*-Zellen werden mit dem resultierenden Phagemid-Plasmid transformiert. Sie sind somit in der

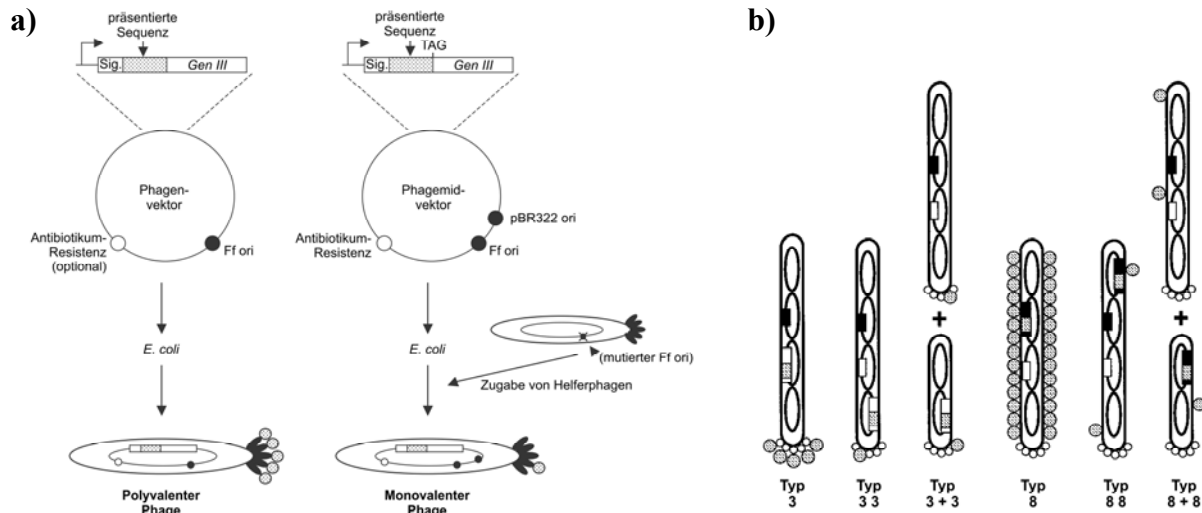


Abbildung 17. Phagen-Display-Systeme. a) Vergleich von polyvalentem mit monovalentem Phagen-Display. Die polyvalente Variante nutzt Phagenvektoren, in denen das vollständige Genom kodiert ist. Die kodierende DNA des zu präsentierenden Proteins wird 5' zum Gen des Hüllproteins kloniert (z. B. *Gen III*), weshalb dieses ausschließlich als Fusionsprotein in den Phagen eingebaut wird. Beim monovalenten Phagen-Display ist die genetische Information für das Fusionsprotein auf einem Phagemidvektor kodiert, der ausschließlich für das Hüllprotein kodiert. Weiterhin weist der Phagemidvektor für Arbeiten mit *E. coli*-Zellen eine Antibiotikumresistenz und einen pBR322 ori auf. Zur Bildung eines vollständigen Phagen ist die Zugabe eines Helferphagen notwendig. Dessen Genom wird aufgrund eines mutierten Phagen-Replikationsursprungs (Ff ori) wesentlich schlechter in Phagenpartikel verpackt. Die entstandenen Phagenpartikel weisen ein Gemisch aus natürlichem Hüllprotein und Fusionsprotein auf. b) Die großen Ovale symbolisieren Virionen mit Phagenvektor, die kleinen besitzen nur einen Phagemidvektor. Die verdrehte Linie steht für die Phagen-DNA, das weiße Rechteck repräsentiert das *Gen III* und das schwarze Rechteck das *Gen VIII*. Typ 3 bzw. Typ 8 werden in polyvalenten Phagen-Display-Ansätzen verwendet. Hingegen wird die Phagemid-Strategie bei den Typen 3 + 3 bzw. 8 + 8 angewandt. Der Typ 33 bzw. 88 stellt eine Zwischenstufe dar, da hier im Phagemidvektor sowohl das natürliche Hüllprotein als auch das Fusionsprotein kodiert ist. (nach [61, 111])

Lage das Hüllprotein-Hybrid zu bilden und mit Hilfe des Signalpeptids auszuschleusen. Da hierfür in der Regel die PelB-Signalsequenz der Pektat-Lyase aus *Erwinia carotovora* [112] genutzt wird, wird das Fusionsprotein mit dem Hüllprotein über eine Pore des Sec-Sekretionsweges in das Periplasma abgegeben. Dieser Sekretionsweg kann nur unter bestimmten Umständen genutzt werden, so darf das Fusionsprotein sich im Cytoplasma nicht falten, keine Cystinbrücken ausbilden und auch keine posttranslationalen Modifikationen aufweisen. Aus diesem Grunde hat die Arbeitsgruppe Plückthun den Einsatz verschiedener Signalpeptide in Phagen-Display-Experimenten getestet [113]. Mit Hilfe der DsbA-Signalsequenz aus *E. coli* gelang es ihnen gefaltete Fusionsproteine mit dem Phagenhüllprotein über den Signalerkennungspartikel abhängigen Weg aus der Zelle auszuschleusen, jedoch ihnen Zum Aufbau funktioneller Phagenpartikel fehlt Phagemidvektoren der restliche, genetische Phagen-Bauplan. Daher muss durch Superinfektion mit Helferphagen das noch nicht vorhandene Phagen-genom den Zellen zugeführt werden. Da der Replikationsursprung des Helferphagen genetisch verändert und somit defekt ist, werden zum Aufbau der Phagenpartikel zwar vorrangig

Hüllproteine des natürlichen Phagen verwendet, in der Regel aber das Phagemid-Plasmid verpackt.

Im Falle des Typ 3+3 ist eine besondere Morphologie der Zelloberfläche im Bezug auf die Superinfektion mit dem Helferphagen zu beobachten. Boeke *et al.* zeigten bereits 1982, dass Zellen, die das vollständige pIII exprimieren, nicht mehr von anderen Phagen infiziert werden können [114]. Weitere Arbeiten ergaben, dass die Aminosäuren im Bereich von Position 51 bis 98 des pIII für den Effekt verantwortlich sind [67]. Für dieses Problem gibt es zwei methodische Lösungsmöglichkeiten, zum einen kann versucht werden die Expression des natürlichen pIII zu unterbinden, zum anderen können Mutanten des pIII-Proteins im Phagen-Display-Systemen eingesetzt werden. Für den zweiten Fall zeigte sich, dass eine Deletion bis zur Aminosäure 249 keine negativen Auswirkungen besitzt, da das Hybrid weiterhin über die CT-Domäne vollständig im Phagen verankert bleibt [115].

1.3.6. Präsentation auf der Oberfläche des Baculovirus

Ein Nachteil des Phagen-Display besteht in der Notwendigkeit, dass die Phagenpartikel durch die Sekretionsmaschinerie von Bakterienzellen aufgebaut werden. Die daraus erwachsenden Probleme wurden bereits in Kapitel 1.3.4. bei der Besprechung der Präsentation von Proteinen auf der Oberfläche von Bakterienzellen erwähnt. Deshalb versuchte die Arbeitsgruppe Grabherr das Prinzip des Phagen-Display auf den Baculovirus und auf Insektenzellen zu übertragen [116]. Bei der Präsentation von Proteinen auf der Oberfläche des Baculovirus oder dem Baculoviren-Display (engl. *baculovirus surface display*) wird das Hüllprotein gp64 von *Autographa californica* NPV genutzt (Abbildung 18a)). Ähnlich wie beim Phagen-Display Typ 33 oder 88 beinhaltet das zirkuläre, doppelsträngige Virengenom zusätzlich zu der Gensequenz für das natürliche gp64 auch eine Variante, die zur Bildung des Hybridproteins führt. Transfektion von Insektenzellen mit dem erhaltenen Virengenom liefert die entsprechenden Virenpartikel, auf denen nun nicht nur eukaryotische Proteine leicht präsentiert werden können, sondern auch diejenigen die eine posttranslationalen Modifikation (z. B. Phosphorylierung, Acylierung sowie N- und O-Glykosylierung) besitzen [117]. Da der Zusammenbau der Virenpartikel an der Zellmembran erfolgt, ist das gp64-Protein und auch seine Hybride in diese eingelagert, so dass das Protein nicht nur auf dem Baculovirus sondern auch auf der Oberfläche infizierter Zellen präsentiert wird. Zur Verbesserung des Baculoviren-Display

wurde auch eine verkürzte Form des gp64 entwickelt, die den zu präsentierenden Proteinen mehr sterische Möglichkeiten eröffnet (Abbildung 18b)) [118].

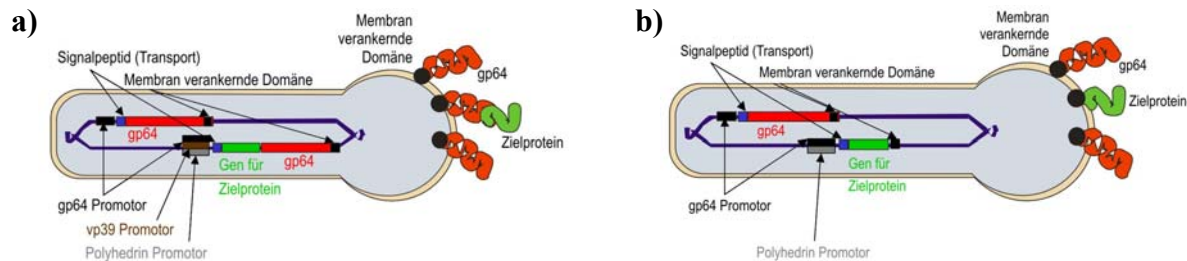


Abbildung 18. Schematische Darstellung der Präsentation von Proteinen auf der Oberfläche von Baculoviren. a) Das Zielprotein wird als Fusion mit dem Hüllprotein gp64 auf der Oberfläche präsentiert. b) In der verbesserten Variante erfolgt die Präsentation eines Gemisches aus natürlichem gp64 und der Fusion aus Membran verankernder Domäne und Zielprotein auf der viralen Oberfläche. (nach [116, 118])

1.3.7. Die *n*-Hybridsysteme

Abschließend soll mit den *n*-Hybridsystemen eine ausschließlich *in vivo* ablaufende Proteinevolutions-Methode näher beleuchtet werden. Historisch gesehen wurde das 2-Hybridsystem entwickelt, um Protein-Protein-Wechselwirkungen *in vivo* im Zellkern von *Saccharomyces cerevisiae* zu untersuchen und durch das Anschalten der Transkription des Reportergens *lacZ*, das für die β -Galaktosidase kodiert, positive Interaktionen sichtbar zu machen [119]. Heute gibt es diverse Weiterentwicklungen und Verbesserungen des ursprünglichen Systems, so sind mittlerweile auch Interaktionen mit DNA, RNA und niedermolekularen Liganden verfolgbar. Enzymatische Veränderungen durch zusätzliche Proteine in Hefe werden ebenfalls genutzt. Außerdem wurden diverse Systeme entwickelt, die auf der ursprünglichen Idee basierend, nun in Säugerzellen ihre Anwendung finden. Inzwischen ist es auch gelungen, die Limitierung der Einschleusung aller Hybride in den Zellkern zu umgehen.

Das Hefe-2-Hybridsystem

Bevor jedoch einige Verbesserungen und Veränderungen erläutert werden, soll zunächst der Urvater aller *n*-Hybridsysteme im Detail besprochen werden. 1988 zeigten Ma und Ptashne, dass das normalerweise zur negativen Regulation an die DNA-bindende Domäne des Transkriptionsfaktors Gal4 bindende Protein Gal80 durch Fusion mit einer Aktivatorodomäne in einen Aktivator umgewandelt werden kann [120]. Wozu als Interaktionspartner noch ein Hybrid aus der DNA-bindenden Domäne des Gal4 und der Bindestelle des Gal80 notwendig

war. Hierdurch zeigte sich zum ersten Mal, dass eine Transkription der DNA möglich ist, sobald durch die Interaktion von Gal80-Bindestelle und Gal80-Protein vermittelt lediglich eine räumliche Nähe zwischen der DNA-bindenden und der Aktivator-domäne bestand. Die kovalente Bindung zwischen beiden Domänen, wie sie in den Transkriptionsfaktoren zu finden ist, war für die Aktivität nicht notwendig. Diese Entdeckung wurde bereits ein Jahr später genutzt, um Protein-Protein-Wechselwirkungen zu detektieren (Abbildung 19) [119]. Nun wurde sowohl je ein Hybrid der DNA-bindenden Domäne (DBD) und dem Protein SNF1 bzw. der Aktivator-domäne (AD) und des Proteins SNF4 in der Hefezelle exprimiert und in den Zellkern geschleust. Hier band das DBD-Hybrid an den Promotor 5' zum Reportergen *lacZ*. Durch Interaktion zwischen SNF1 und 4 wurde die räumliche Nähe zwischen DBD und AD hergestellt, was die Transkription des *lacZ*-Gens zur Folge hatte. Dies resultierte schließlich in der Expression der β -Galaktosidase, die das Substrat 5-Brom-4-chlor-3-indoxyl- β -D-galaktopyranosid (X-Gal) hydrolysierte und es daher zur Ausbildung blau gefärbter Hefezellen kam. Als Abwandlung wurde die DBD des Hefeproteins Gal4 durch die DBD des Proteins LexA aus *E. coli* ersetzt, welches unbeabsichtigte Interaktionen mit den natürlichen Proteinen in der Hefezelle ausschloss [121]. Außerdem nutzten Weiterentwicklungen des Hefe-2-Hybridsystems zusätzlich zur Transkription des *lacZ* auch diejenige von Auxotrophie-Markern, d. h. es wurde der Zelle die Produktion einer essentiellen Aminosäure nur erlaubt, wenn durch eine positive Wechselwirkung der beiden Domänen die Expression eines Aminosäuresynthesegens eingeschaltet wurde [122, 123]. Dies führte zur Durchführung einer sehr effizienten Leben/Tod-Selektion, die der Zelle viel Stress aufbürdete.

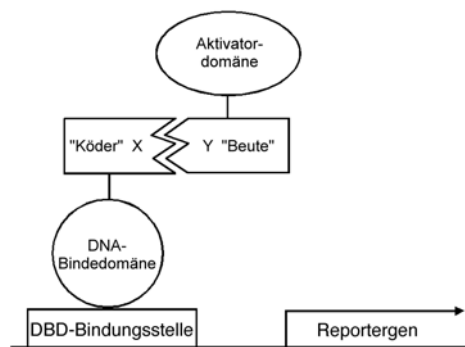


Abbildung 19. Prinzip eines 2-Hybridsystems. Nur wenn die Bindung zwischen X („Köder“) und Y („Beute“) die Aktivator-domäne (AD) in räumliche Nähe zur DNA-Bindedomäne (DBD) bringt, kann das Reportergen transkribiert werden.

Es zeigte sich schnell, dass 25% bis 45% der Resultate aus umfangreichen Anwendungen von Hefe-2-Hybridsystemen als falsch positiv bezeichnet werden mussten, d. h. sie traten auf,

obwohl die experimentellen Rahmenbedingungen ihre Existenz nicht zulassen sollten [124, 125]. Falsch positive Analyseergebnisse können aufgrund ihrer Art in zwei Kategorien unterteilt werden. Die erste Kategorie entsteht durch methodisch-technische Probleme während des *n*-Hybridexperiments. Sowohl das DBD- als auch das AD-Hybrid kann in Abhängigkeit des jeweils fusionierten Proteins autokatalytisch die Transkription des Reportergens veranlassen. Weiterhin besteht während der Durchführung eine hohe Konzentration beider Hybride im Zellkern, so dass auch unspezifische Interaktionen die Transkription auslösen können. Die zweite Kategorie geht auf falsche, biologische Rahmenbedingungen während des Experimentes zurück, d. h. die Notwendigkeit der Wechselwirkung aller Hybride im Zellkern ermöglicht Interaktionen, die in der normalen Zellumgebung nicht auftreten würden.

2-Hybridsysteme ohne Limitierung auf den Zellkern

Um die Limitierung auf den Zellkern zu umgehen, wurden zwei Varianten entwickelt. Variante 1, das Membran-assoziierte Hefe-2-Hybridsystem (engl. *membrane yeast two-hybrid system*, *MYTH*), ermöglicht die Untersuchung von Protein-Protein-Wechselwirkungen in der Membran oder zwischen einem Membran- und einem cytosolischen Protein (Abbildung 20a) [126]. In beiden Fällen wird die Rekonstitution eines gespaltenen Ubiquitins ausgenutzt [127], um durch die Ubiquitin-spezifische Protease den an den C-terminalen Teil des Ubiquitins fusionierten Transkriptionsfaktor freizusetzen. In Variante 2, die für cytosolische Protein-Interaktionen entwickelt wurde, wurde die Idee von MYTH in der Weise abgewandelt, dass nun noch das Protein Ost4p einem Hybrid hinzugefügt wurde [128]. Dieses Protein ist ein integraler Bestandteil der Membran des endoplasmatischen Retikulums von Hefezellen. In Anlehnung an MYTH wurde diese Methode cytosolisches Hefe-2-Hybridsystem (engl. *cytosolic yeast two-hybrid system*, *cytoYTH*) genannt. In Säugerzellen wurde zur Untersuchung cytosolischer Protein-Interaktionen u. a. die gespaltene Protease des *tabacco etch virus* (TEV) genutzt (Abbildung 20c) [129]. Die Wiederherstellung der Aktivität der gespaltenen Protease bewirkt die Freisetzung eines Transkriptionsfaktors oder einer dadurch aktivierten Luciferase. Dem System gereicht zum Vorteil, dass die Erkennungssequenz der TEV-Protease in Säugerzellen nicht vorkommt, weshalb dort keine ungewollten Reaktionen ablaufen können. Eine weitere Methode zur Aufklärung von Protein-Protein-Wechselwirkungen in Säugerzellen beschreibt das 2001 entwickelte MAPPIT-System (*mammalian protein-protein interaction trap*) (Abbildung 20b) [130]. Hierbei wird der JAK/STAT-Signalweg (JAK: Janus Kinase, STAT: Signalübermittler und Transkriptionsaktivator (*Signal Transducer and Activator of Trans*

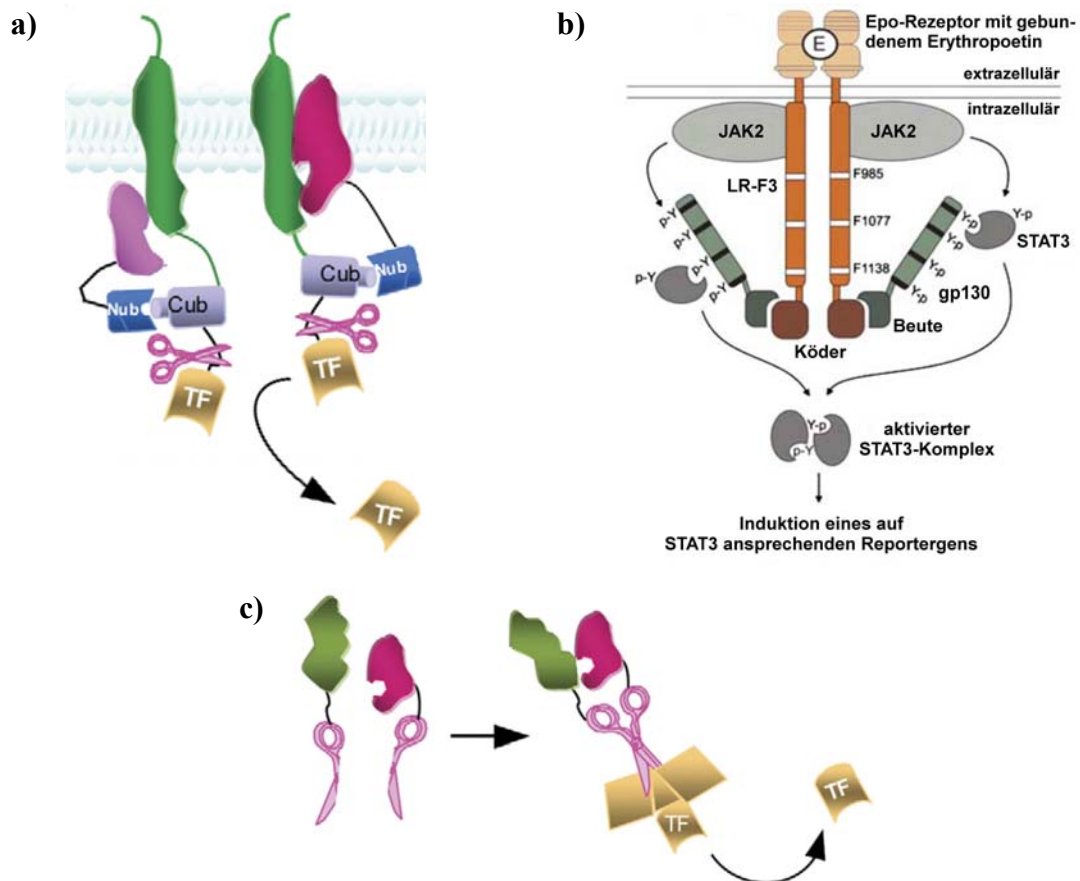


Abbildung 20. Das Hefe-2-Hybridsystem erweiternde Verfahren. a) MYTH ermöglicht die Untersuchung von Protein-Protein-Wechselwirkungen in Systemen, wo mindestens ein Partner membrangebunden vorliegt. Durch Interaktion der beiden Partner wird ein gespaltenes Ubiquitin rekonstituiert und durch eine Ubiquitin-spezifische Protease (Schere) wird daraufhin ein Transkriptionsfaktor freigesetzt. b) Für Säugerzellen wurde das MAPPIT-System entwickelt, um Interaktionen von Proteinen zu studieren. Das Köder-Protein ist an eine Fusion aus dem extrazellulären Teil des Erythropoetin-Rezeptor und einer mutierten Domäne des Leptin-Rezeptors (LR-F3; alle Tyr-Bindestellen für STAT3 zu Phe mutiert) gebunden. Das Beute-Protein bildet eine Fusion mit dem C-terminalen Teil von gp130, das Bindestellen für STAT3 aufweist. Durch Bindung von extrazellulärem Epo an den Rezeptor phosphoryliert die an LR-F3 gebundene Janus-Kinase (JAK2) STAT3, das sich durch die Köder-Beute-Interaktion in räumlicher Nähe befindet. Zwei abdissoziierte STAT3 bilden einen aktivierten Komplex, der die Expression des Reportergens induziert. c) Die Abbildung zeigt das cytoYTH-System. Die Interaktion zweier cytosolischer Proteine rekonstituiert die TEV-Protease (Schere), die entweder einen Transkriptionsfaktor freisetzt oder das Enzym Luciferase aktiviert. (nach [131, 132])

cription)) ausgenutzt, um die Transkription eines Reporters z. B. der Luciferase einzuschalten. Das Pendant zum DBD-Hybrid bildet hier die Fusion aus der extrazellulären Ligandenbindestelle des Erythropoetin-Rezeptors (EpoR), der cytoplasmatischen Domäne eines veränderten Leptin-Rezeptors und dem zu untersuchenden ersten Bindungspartner. An jenes Hybrid kann zwar die Janus Kinase andocken, aber es ist keine direkte Bindungsstelle für das STAT vorhanden. Dieses Problem wird gelöst durch das zweite Hybridprotein, bestehend aus dem zweiten Interaktionspartner und dem C-terminalen Teil des gp130-Proteins, das vier STAT-Bindestellen aufweist. Daher kann die Janus-Kinase während der Protein-Protein-Interaktion den STAT-Transkriptionsfaktor durch Phosphorylierung aktivieren. Zwei Tatsachen können

als besonders vorteilhaft hervorgehoben werden. Erstens findet die Interaktion ausschließlich im Cytosol statt und zweitens wird das System erst durch Zugabe von Epo dimerisiert und dadurch die Janus Kinase aktiviert.

Das 1- und 3-Hybridsystem

Neben der Analyse von Protein-Protein-Wechselwirkungen stand die *in vivo* Untersuchung anderer Interaktionen mit Beteiligung von Proteinen im besonderen Fokus der Wissenschaft. Die einfachste experimentell zugängliche Interaktion stellt diejenige zwischen DNA und Protein dar. Im sogenannten 1-Hybridsystem ist die AD direkt an die DBD gebunden (Abbildung 21) [133, 134]. Mit diesem System ist sowohl die Suche nach möglichen DBDs für eine bekannte DNA-Sequenz als auch die Entdeckung neuer DNA-Bindestellen zu einer bekannten DBD denkbar.

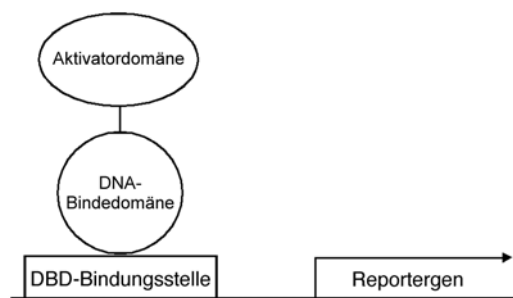


Abbildung 21. Das 1-Hybridsystem. Mit Hilfe dieses Systems kann nach unbekannten DNA-Bindedomänen für bekannte DNA-Sequenzen gesucht werden, aber auch die Suche nach neuen Bindestellen für bekannte DNA-Bindedomänen durchgeführt werden.

Sollen hingegen komplexe Interaktionen mit Proteinen detektiert werden, kann aus verschiedenen Varianten von 3-Hybridsystemen (Abbildung 22) ausgewählt werden. Kann das Hybrid der AD nur an das posttranslational modifizierte (meist phosphorylierte) Hybrid der DBD binden, ist die Ko-Expression des entsprechenden Enzyms notwendig [135, 136]. Diese Methode gleicht zwar den Nachteil aus, dass einige eukaryotische Modifikationen von Hefe normalerweise nicht durchgeführt werden können, jedoch im Hinblick auf die Anwendung von *n*-Hybridsystemen in der ursprünglichen Umgebung ist davon auszugehen, dass sie in Zukunft von der methodischen Durchführung in Säugerzellen ersetzt wird.

Protein-3-Hybridsysteme gewähren Einblicke in Wechselwirkungen zwischen DBD- und AD-Hybrid die über ein drittes Protein vermittelt werden [137] oder aber die Interaktion benötigt eine vorhergehende Dimerisierung des DBD-Hybrids [138].

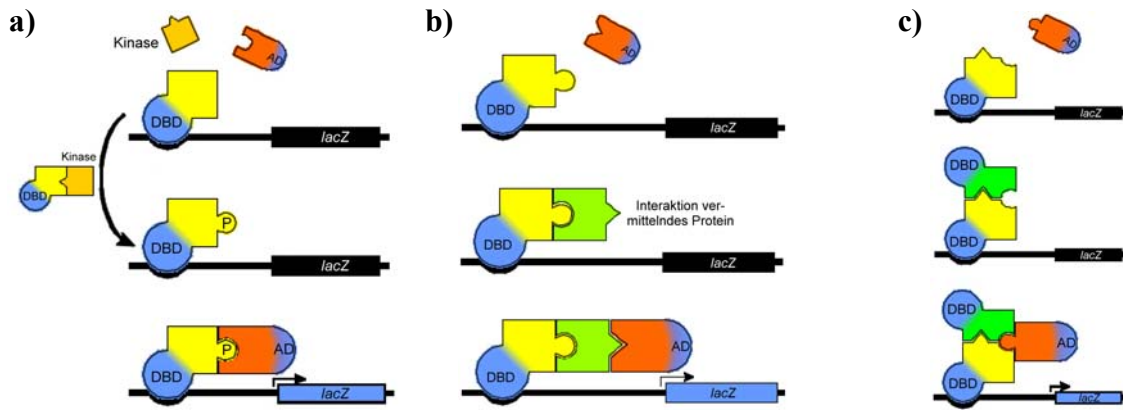


Abbildung 22. Verschiedene Varianten eines 3-Hybridsystems. a) Ist die Interaktion nur mit einem phosphorylierten Protein möglich, muss eine Kinase koexprimiert werden. b) Der Einsatz eines zwischen Köder- und Beute-Protein die Interaktion vermittelnden dritten Proteins (grün) ist ebenfalls möglich. c) In anderen Fällen ist die gewünschte Protein-Protein-Wechselwirkung nur möglich, sofern das Hybrid der DNA-Bindedomäne dime- risiert vorliegt. (nach [139])

Die Analyse möglicher Wechselwirkungen zwischen RNA-Motiven und Proteinen bedarf einer Präsentation der unbekannten RNA-Region in Kombination mit einem bekannten RNA/Protein-Paar (Abbildung 23a)) [140, 141]. Zu diesem Zweck besteht das DBD-Hybrid aus der DBD des LexA-Proteins und dem Hüllprotein MS2 an das ein Teil des RNA-Moleküls bindet. Der zweite Teil der RNA wird benutzt, um aus der Bibliothek an AD-Hybriden Bindungspartner zu selektieren. In ähnlicher Weise werden auch niedermolekulare Liganden auf ihre Bindung an das AD- oder beide Hybride geprüft (Abbildung 23b)) [142, 143].

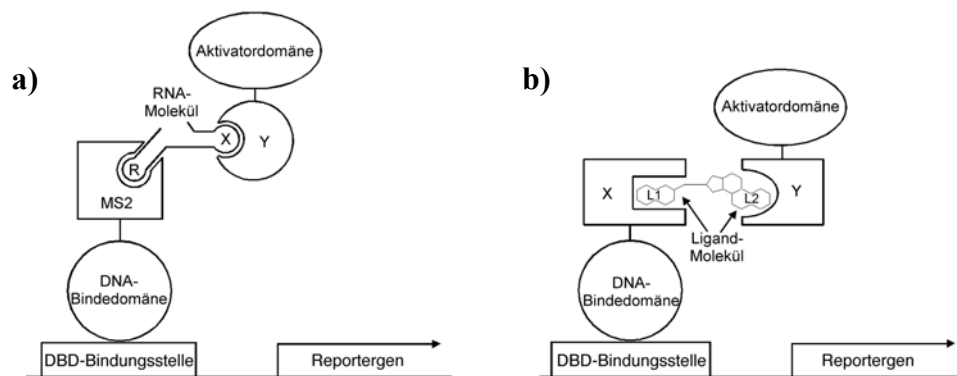


Abbildung 23. 3-Hybridsysteme mit Interaktionsvermittlung durch RNA- bzw. Ligand-Moleküle. a) Um die Wechselwirkung zwischen der RNA X und dem Protein Y zu testen, wird X mit Hilfe der DBD-MS2-Fusion und der bekannten Interaktion zwischen MS2 und dem Bereich R der RNA präsentiert. b) Die Wechselwirkung zwischen Protein X und Y kommt nur durch die gegenseitige Bindung eines niedermolekularen Liganden zu- stande.

Ein System zur Analyse organischer Molekülliganden in Säugerzellen wurde 2006 mit MASPIT (*mammalian small molecule interaction trap*) vorgestellt (Abbildung 24) [132]. Die Idee ähnelt sehr stark dem bereits beschriebenen MAPPIT-System (Abbildung 20b)) nur ist

hier der rezeptorgebundene erste Interaktionspartner durch die Dehydrofolat-Reduktase (DHFR) ersetzt worden. Den Bindungspartner der DHFR bildet eine Verbindung bestehend aus Methotrexat (natürlicher Bindungspartner der DHFR) und dem Liganden. Der somit als Fusion mit dem Methotrexat präsentierte Ligand kann seinerseits mit dem zweiten Hybrid des MAPPIT-Systems interagieren, was zur Phosphorylierung und Aktivierung des STAT-Transkriptionsfaktors durch die Janus Kinase führt. Die bereits beim MAPPIT-System erwähnten Vorteile gelten analog auch beim MASPIT-System.

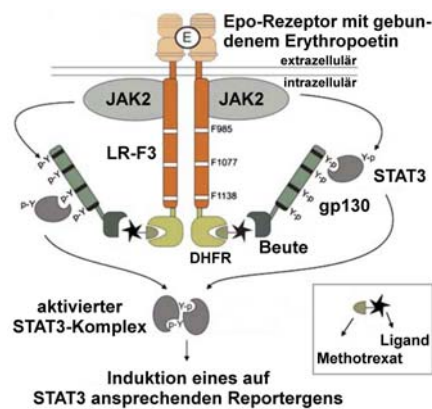


Abbildung 24. Schematische Darstellung des MASPIT-Systems. Im Gegensatz zum MAPPIT-System (Abbildung 20b)) ist das Köder-Protein durch die Dehydrofolat-Reduktase (DHFR) ersetzt worden. Diese interagiert mit der Fusion aus Methotrexat und dem über einen PEG-Abstandshalter angebundenen Liganden. Eine Wechselwirkung des Liganden mit dem Beute-Protein bewirkt, dass STAT3 in räumliche Nähe zur Janus-Kinase (JAK2) gebracht wird und diese nach Bindung von Erythropoetin an den entsprechenden Rezeptor STAT3 phosphorylieren kann. Zwei abdissoziierte STAT3 bilden einen aktivierten Komplex, auf den das Reportergen schließlich anspricht. (nach [132])

reverse 2-Hybridsysteme

Im Sinne der pharmazeutischen Industrie kann das 3-Hybridsystem mit kleinen Liganden zur Durchmusterung auf Bindungspartner benutzt werden, jedoch erfahren auch Moleküle, die eine bekannte Interaktion unterbinden können, als Arzneimittel vielfach Anwendung. Deshalb wurde das reverse Hefe-2-Hybridsystem (engl. *reverse yeast two-hybrid system, rYTH*) in An- oder Abwesenheit kleiner organischer Moleküle bzw. Peptide entwickelt (Abbildung 25) [144-146]. In Umkehrung der Idee des 2-Hybridsystems bewirkt das Anschalten der Transkription des *URA3*-Gens die Expression der Oritidin-5'-Phosphatdecarboxylase, die das Substrat 5-Fluoroorotsäure zum giftigen 5-Fluorouracil umsetzt [147]. Die Transkription kann auf zwei Wegen verhindert werden, zum einen kann eines der beteiligten Proteine durch Peptide oder organische Moleküle blockiert, zum anderen kann ihre Wechselwirkung durch Mutationen unterbunden werden.

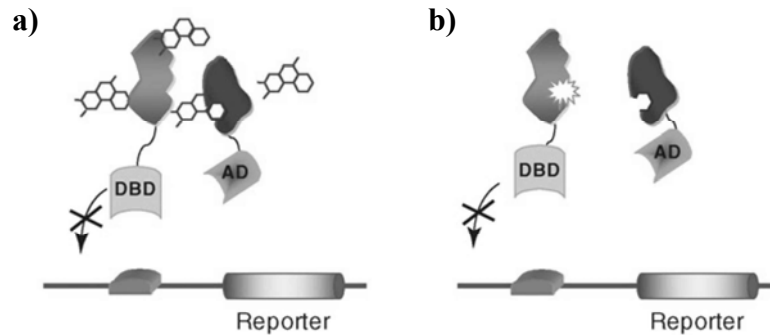


Abbildung 25. Darstellung der Anwendung eines reversen Hefe-2-Hybridensystems (rYTH). a) Die Bindung eines niedermolekularen Liganden verhindert die Protein-Protein-Interaktion. Hierdurch wird die Transkription von *URA3* verhindert und somit die Verwandlung von 5-FOA in das giftige 5-Fluorouracil. b) Hier wird die Interaktion durch Mutationen in der Bindestelle eines der beiden Proteine unterbunden. (nach [131])

In einer Abwandlung des MAPPIT-Systems konnte auch das Verhindern der Interaktion der zu untersuchenden Proteine in Säugerzellen analysiert werden (rMAPPIT) (Abbildung 26) [148]. Hierzu musste zum einen eine STAT-Bindestelle am Leptin-Rezeptor wiederhergestellt und zum anderen musste im zweiten Hybrid der C-terminale Teil des gp130-Proteins gegen eine die Janus-Kinase inhibierende Proteindomäne ausgetauscht werden. Die Aktivierung der Transkription durch STAT kann daher nur erfolgen, sofern die Interaktion zwischen den zu untersuchenden Proteinen durch Zugabe eines Liganden oder Peptids effektiv unterbunden wird.

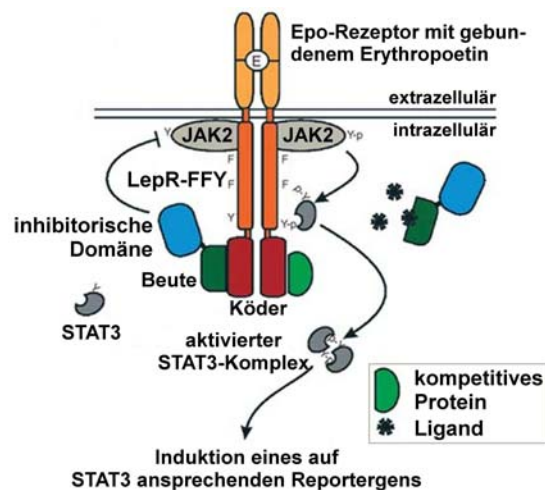


Abbildung 26. rMAPPIT, ein System zum Test auf kompetitive Proteine und inhibitorische Liganden. Das Beute-Protein ist mit einer auf die Janus-Kinase (JAK2) inhibitorisch wirkenden Domäne fusioniert. Daher bewirkt die Verdrängung des Beute- vom Köder-Protein durch entweder kompetitive Proteine oder die inhibitorische Bindung eines Liganden an das Beute-Protein eine Aktivierung der Kinase. Diese phosphoryliert nun das an den Leptin-Rezeptor (LepR-FFY) gebundene STAT3, was zur Induktion eines auf STAT3 ansprechenden Reportersystems führt. (nach [148])

Das im vorhergehenden Kapitel beschriebene Phagen-Display zeichnet sich durch die Produktion eines Phagenpartikel-Bibliotheksgemisches durch die *E. coli*-Zellen aus. Beim Hefe-2-

Hybridsystem liegt in jeder Zelle nur ein zu untersuchendes Proteinpaar vor, wobei die Zellen leicht vereinzelt werden können. Die Anwendung von Hochdurchsatz-Analyseverfahren wandelt nun den Selektionsansatz (nur die den experimentellen Bedingungen am Besten angepassten Proteine einer Bibliothek überstehen die Methode) in einen Screening- oder Durchmusterungsansatz (alle denkbaren Kombinationen werden experimentell erfasst und die Resultate dahingehend analysiert, dass nur die Proteine mit den gewünschten Eigenschaften von den übrigen getrennt werden) um. Dieser Ansatz ist zwar kostenintensiv, kann aber leicht automatisiert oder zumindest in kontinuierlich wiederkehrende Prozesse unterteilt werden. Deshalb wird er gerne in der Interaktomsuche für potentielle Arzneimittel oder auch beim Aufbau von Proteinnetzwerken unterschiedlicher Organismen angewandt. Im Falle der Proteomanalyse zeigte die Tatsache, dass sich haploide Hefezellen zu diploiden Zellen paaren können, besondere Vorteile [149]. So war es möglich, einen Zelltyp mit dem Gen für das DBD-Hybrid zu transformieren, den anderen mit demjenigen für das AD-Hybrid. Anschließend mussten die zwei unterschiedlichen Zellen nur noch miteinander kombiniert werden und es entstand ein funktionsfähiges Hefe-2-Hybridsystem. Mit dieser Methode wurden z. B. die Proteine aus allen 6000 möglichen Leserastern der Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae* auf Interaktionen untereinander analysiert [150, 151].

Projekt 1:

Entwicklung eines mit Hilfe organischer Moleküle
schaltbaren Proteins durch das Hefe-2-Hybridsystem

Am Beispiel der SH3-Domäne der
c-Abl Tyrosin-Kinase

2. Einleitung zur Entwicklung eines schaltbaren Proteins (Projekt 1)

2.1. Kontrolle von Proteinfunktionen durch molekulare Schalter

2.1.1. Natürliche Schalter

Um die Aktivität von Proteinen zu regulieren, bedient sich die Natur molekularer Schalter, die durch ihre Bindung an bestimmte Bereiche eines Proteins in der Regel Veränderungen in dessen Struktur herbeiführen. Hierbei kann die sogenannte allosterische Regulation, d. h. die strukturelle Veränderung eines Proteinbereiches oder einer -domäne durch Bindung eines Effektormoleküls, an einem z. T. räumlich weit vom katalytischen Zentrum entfernten Bereich des Proteins erfolgen. Daher muss die Information der Bindung des Effektormoleküls durch Umstrukturierung unter Umständen großer Teile des Enzyms bis zum Auftreten des gewünschten Effektes, z. B. einer katalytischen Funktion, weitergeleitet werden. Natürliche Schalter können sowohl als Inhibitoren oder Aktivatoren bezüglich einer Proteinfunktion auftreten und binden in der Regel an das Protein mit einer sehr hohen Spezifität. Außerdem besitzen sie durch ihre geringe Größe die Möglichkeit, in das Protein hineinzudiffundieren und Bindetaschen zu besetzen, die für Protein/Protein-Interaktionen unzugänglich sind.

Als eines von vielen Beispielen, sei hier das jüngst veröffentlichte RTX-Protein (*repeats in toxin*) des Bakteriums *Vibrio cholerae* vorgestellt [152]. Das RTX-Protein verwandelt sich in einem autokatalytischen Prozess durch eine interne Cystein-Protease-Domäne bei Eintritt in eine eukaryotische Zelle von einem Protoxin in ein Toxin, das durch die Zerstörung von Aktin für den verheerenden Verlauf der Cholera-Krankheit mitverantwortlich ist. Die Steuerung der autoproteolytischen Funktion beruht auf der Aktivierung des Proteins nach Bindung des Moleküls Inositolhexaphosphat in einer positiv-geladenen Tasche. Durch die Bindung des Effektormoleküls wird eine 22 Aminosäuren umfassende β -Haarnadel-Struktur, die den Eingang des katalytischen Zentrums der Cystein-Protease für Substrat verschließt, in ihrer Struktur verändert (Abbildung 27). Hierdurch wird der Eingang der Protease für die RTX-Aminosäuresequenz frei zugänglich und diese durch katalytisch zerteilt, um die Umwandlung vom Pro- zum Toxin zu bewirken. Weiterführende Studien an Mutanten des RTX-Proteins haben gezeigt, dass die Bindung des Inositolhexaphosphat essentiell für die Proteaseaktivität ist [152]. Dieser Umstand ist bemerkenswert, da ausschließlich eukaryotische Zellen das Effektormolekül in einer cytosolischen Konzentration von mehr als 10 μ M aufweisen. Somit

ist sichergestellt, dass die Umwandlung vom Pro- zum Toxin erst am beabsichtigten Wirkungsort, nämlich in den Epithelzellen des Dünndarms, geschieht.

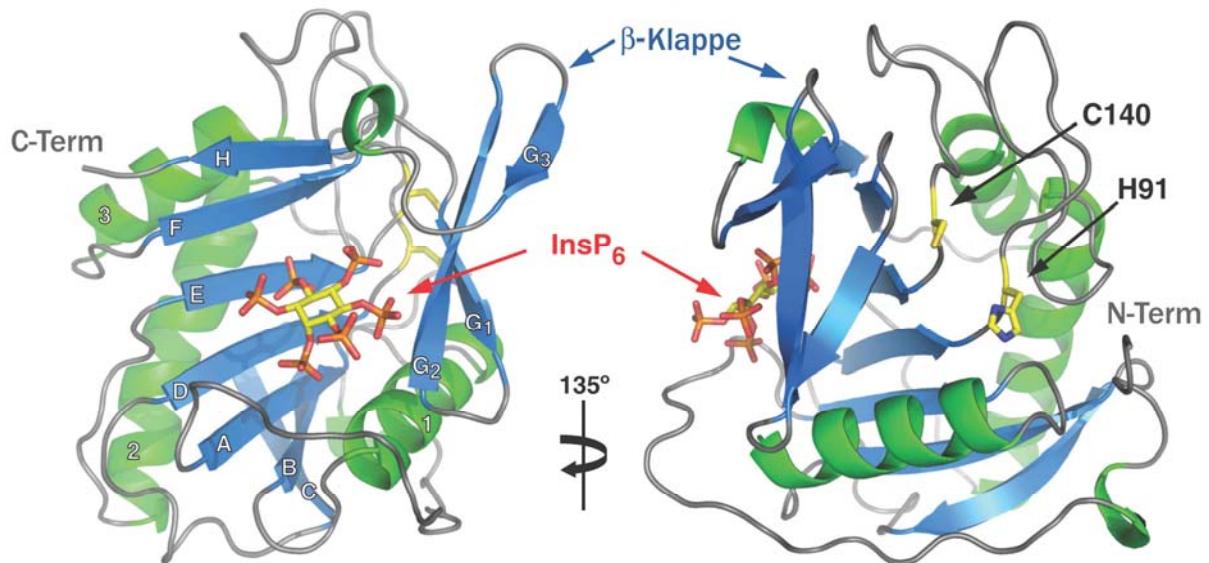


Abbildung 27. Kristallstruktur des RTX-Proteins aus *Vibrio cholerae* mit gebundenem Effektormolekül Inositolhexaphosphat (InsP₆). Bindung von InsP₆ verändert die Struktur und die β-Klappe gibt den Weg zum aktiven Zentrum der Cys-Protease frei. (nach [152])

2.1.2. Schaltung mittels induzierter Dimerisierung von Proteindomänen

Neben den auf natürlichem Wege schaltbaren Proteinen zeigte die Forschung vor allem in den letzten 10 Jahren ein großes Interesse daran, natürlich vorkommende Proteine durch Mutationen künstlich und zeitlich aufgelöst an- und/oder ausschaltbar zu machen. Hierbei soll der Schaltprozess in der Regel von kleinen, organischen Molekülen herbeigeführt werden, da sie leicht in Zellen eingeschleust oder bei *in vitro*-Experimenten appliziert werden können. Durch die Bindung des Effektormoleküls und die nachfolgende Proteinaktivität bzw. -inaktivität können z. B. Fragen nach der Rolle bestimmter Enzyme z. B. im Gefüge des Zell-Haushaltes oder bei medizinisch relevanten Prozessen untersucht werden.

In diesem Zusammenhang können mehrere Möglichkeiten der Schaltung von Proteinfunktionen angewandt werden. Die erste Herangehensweise besteht in der künstlichen, räumlichen Trennung zweier Proteinfragmente, die sowohl aus Sequenzabschnitten als auch aus diskreten, z. T. vollständig gefalteten Untereinheiten des Proteins bestehen können. Eine an jedes Proteinfragment fusionierte weitere Proteindomäne kann durch Zugabe eines organischen Moleküls dimerisiert werden, wodurch die beiden Fragmente miteinander assoziieren und das

Protein meist nach struktureller Reorganisation seine Aktivität zurückgewinnt. Ein sehr häufig in der Literatur erwähntes, durch das Molekül Rapamycin und seine Derivate kontrolliertes, heterologes Dimerisierungspaar [153] besteht aus FKBP12 (FK506 bindendes Protein) [154] und der FRB- (FKBP und Rapamycin bindende) Domäne der Proteinkinase mTOR (Ziel des Rapamycin in Säugetieren, engl. *mammalian target of rapamycin*) oder auch FRAP1 (FKBP12-Rapamycin assoziierendes Protein 1) genannt [155]. Zur Verdeutlichung der Bandbreite an Anwendungen jenes Heterodimerisierungspaares seien nachfolgend einige Beispiele aufgeführt. So gelang es in Mäusen nach dem Vorbild der 3-Hybridsysteme (siehe Kapitel 1.3.7) durch künstliche Assoziation der DNA-bindenden und der Aktivatorordomäne die Transkription zu kontrollieren [156]. Auch die Glykosylierung von Zelloberflächen kann durch Rapamycinzugabe gesteuert werden, indem die Bildung des Chimärs aus der Lokalisierungsdomäne der Fukosyltransferase VII und der katalytischen Domäne der Fukosyltransferase IV initiiert wird (Abbildung 28a)) [157, 158]. Hierbei bewirkt die Lokalisierungsdomäne die Positionierung des FKBP im Golgi-Apparat und das Hybridprotein aus FRB und katalytischer Domäne wird vorwiegend aus der Zelle heraussekretiert. Daher führt die Zugabe von Rapamycin durch die gleichzeitige Bindung von FKBP und FRB zur notwendigen Lokalisierung der katalytischen Domäne im Golgi-Apparat. Weiterhin konnte durch die Dimerisierung mittels Rapamycin die Aktivität des künstlich gespaltenen VMA-Inteins aus *Saccharomyces cerevisiae* wiederhergestellt werden (Abbildung 28b)) [159, 160]. Inteine katalysieren die Verknüpfung der sie flankierenden Proteinsequenzen über eine native Peptidbindung (ausführliche Erklärung siehe Kapitel 7.1). Voraussetzung für diesen Ansatz waren Inteinfragmente, die in Abwesenheit von Rapamycin nicht miteinander assoziierten und somit keine Aktivität aufwiesen.

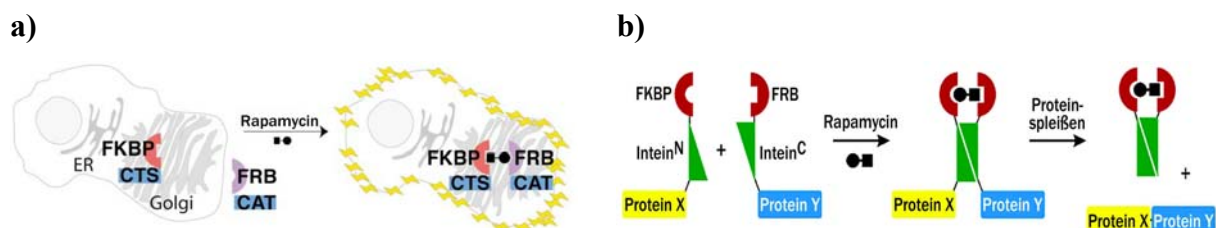


Abbildung 28. Dimerisierung des Systems aus FKBP und FRB über die Bindung des Effektormoleküls Rapamycin zur Steuerung der Glykosylierung von Zellen (a) oder der Initialisierung des *trans*-Proteinspleißens (b). (nach [157, 159])

2.1.3. Kontrolle über zusätzliche Ligandbindemotive

Eine zweite Steuerungsmöglichkeit besteht in der gezielten Einführung eines Ligandbindemotivs in die Struktur des Zielproteins. In diesem Fall veranlasst die Bindung des Liganden entweder eine strukturelle Umorganisation des Proteins oder die Fixierung in einer bestimmten Konformation. In den vergangenen Jahren wurde für diese Art der Proteinfunktionskontrolle häufig das zwei Arsenatome aufweisende tetradentate Derivat des Fluorescein (FLAsH) eingesetzt, das bevorzugt an die Aminosäuresequenz Cys-Cys-Pro-Gly-Cys-Cys bindet (Abbildung 29) [161, 162].

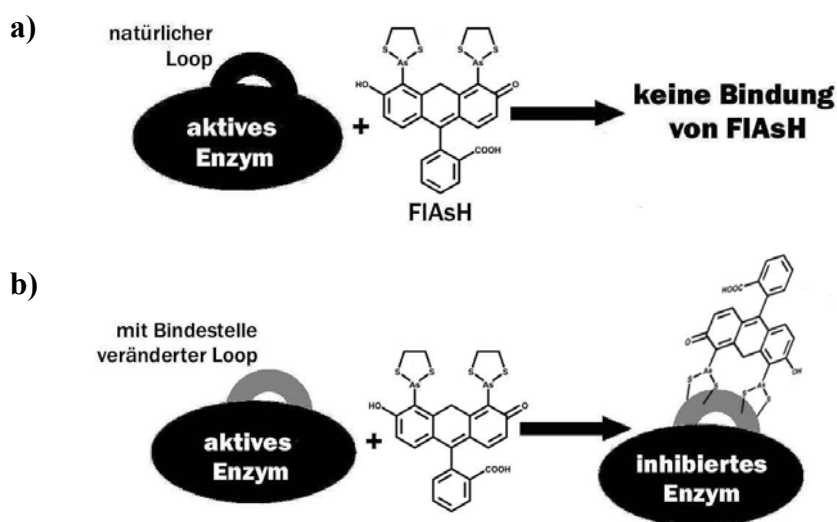


Abbildung 29. Selektive Steuerung der Enzymaktivität mit Hilfe des FLAsH-Liganden. Die Bindung des FLAsH-Bausteins an Enzyme mit veränderter Ligand-Bindestelle bewirkt eine Inhibierung durch Stabilisierung der inaktiven Proteinstruktur. (nach [163])

Erster *et al.* schlugen vor, jene 6 Aminosäuren an unterschiedlichen Positionen in das Zielprotein zu integrieren und die Auswirkungen auf das Zielprotein in einem Verfahren, das als Liganden-Interaktions Untersuchung (engl. *ligand interaction scan*, *LIScan*) bezeichnet wurde, zu testen [164]. Als Modell wurde die TEM-1- β -Laktamase ausgewählt, deren Aktivität durch die Ligandbindung in Abhängigkeit der Insertionsposition sowohl herauf- als auch herabgesetzt werden konnte. Die Arbeitsgruppe Bishop arbeitete mit der Protein Tyrosin-Phosphatase aus T-Zellen, deren allosterische Inhibierung durch die FLAsH-Bindung in einem Experiment mit dem Substrat *p*-Nitrophenylphosphat nachgewiesen werden konnte [165]. Jedoch wurde festgestellt, dass sich jede Insertion der Bindestelle so stark auf die Phosphatase-Aktivität auswirkte, dass keine Mutante eine dem natürlichen Protein vergleichbare Aktivität aufwies. Daher wurde versucht, das Bindemotiv auf ein Minimum zu reduzieren. Zwei Punktmutationen zu Cystein reichten schließlich aus, um ohne Ligand eine natür-

liche Phosphatase-Aktivität zu messen und durch Bindung diese um den Faktor 12 zu verringern [163].

Wesentlich schwieriger gestaltet sich die Regulation des Zielproteins über die Kontrolle eines weiteren Proteins, in dessen Gerüst es molekularbiologisch hineingefügt wurde. Erfolgreich durchgeführt wurde die Methode 2004 durch die Insertion der TEM-1- β -Laktamase in das Gerüst des MBP (Maltose bindendes Protein) [166]. Die Bindung des Schaltermoleküls Maltose durch MBP bewirkte Veränderungen in der Gesamtstruktur der Chimäre, so dass die TEM-1- β -Laktamase ihre antibiotische Wirkung erfüllen konnte. Es konnte nicht nur gezeigt werden, dass die Chimäre die Antibiotika-inaktivierende Funktion nur in Anwesenheit des Effektors Maltose aufwies, sondern auch dass die Maltose sich als reversibler Schalter benutzen ließ.

2.1.4. Die *bump and hole*-Strategie

In vielen Untersuchungen ist es wünschenswert, Proteinfunktionen in lebenden Zellen zu analysieren. Die Limitation besteht jedoch darin, dass die Zielproteine meist natürlich in der Zelle vorkommen. Zur gezielten Beobachtung der Aktivität des Zielproteins muss sie von derjenigen der natürlich in der Zelle vorkommenden „Verwandten“ unterschieden werden können. Zu diesem Zweck wurde der sogenannte *bump and hole* Ansatz (in etwa Ausbuchtung und Loch) entwickelt (Abbildung 30) [167]. Hierbei wird zum einen der Ligand oder das Substrat um z. B. eine weitere funktionelle Gruppe oder Seitenkette erweitert (also um eine Ausbuchtung) und zum anderen die entsprechende Bindetasche des Proteins durch kompensierende Mutationen größer in kleine Aminosäuren erweitert (also im übertragenen Sinne ein Loch gebildet). Als Beispiel sei hier die Veränderung der ATP-Bindetasche der Abl-, Src- und anderer Kinasefamilien erwähnt [168-172]. In der jeweiligen ATP-Bindestelle wurde eine große Aminosäure in der Nähe des N⁶-Atoms des ATP gewählt, um sie so zu verkleinern, dass auch N⁶-Benzyl-ATP als Substrat der Kinasen fungieren kann. Dieses künstliche Substrat kann hingegen von den natürlichen Kinasen nicht genutzt werden, da die Bindetasche keine Möglichkeit besitzt sich an den Liganden anzupassen, um das zu große ATP-Derivat aufzunehmen.

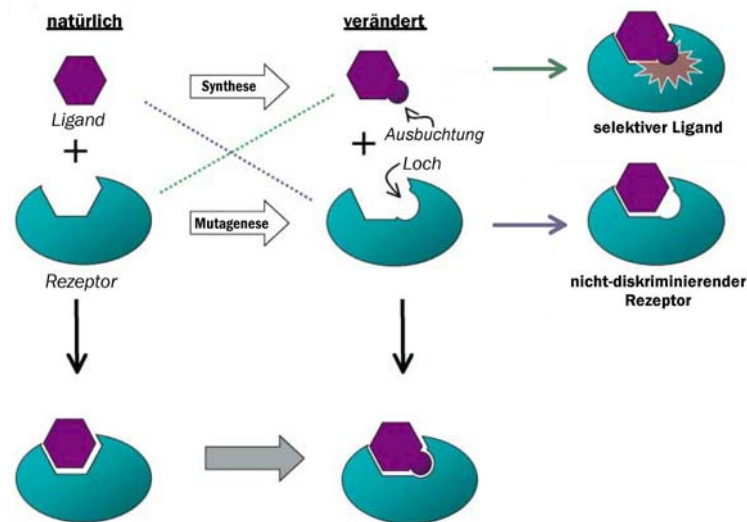


Abbildung 30. Schematische Darstellung der *bump and hole*-Strategie. Der durch Synthese veränderte Ligand kann ausschließlich an das durch Mutation veränderte Protein binden, der natürliche Ligand kann dagegen an beide Rezeptorstellen andocken. (nach [173])

Zwar wird der künstliche Ligand vom natürlichen Protein nicht mehr erkannt, es ist jedoch durchaus möglich, dass der natürliche Ligand weiterhin an das evolvierte Protein bindet. Um dieses Problem zu lösen, wurde die *bump and hole*-Strategie zusätzlich in umgekehrter Vorgehensweise auf die Bindetasche und den Liganden angewandt (Abbildung 31) [174]. Weiterhin wurden die Anziehungs- bzw. Abstoßungskräfte zwischen geladenen Aminosäuren bzw. Bereichen ausgenutzt, entweder durch Neutralisation [175, 176] oder durch wechselseitigen Austausch der Ladungen [176, 177]. Schließlich wurde versucht, den Liganden selektiv und irreversibel in der Tasche zu binden, indem zwischen dem Liganden und dem modifizierten Protein eine kovalente Bindung etabliert wurde [170].

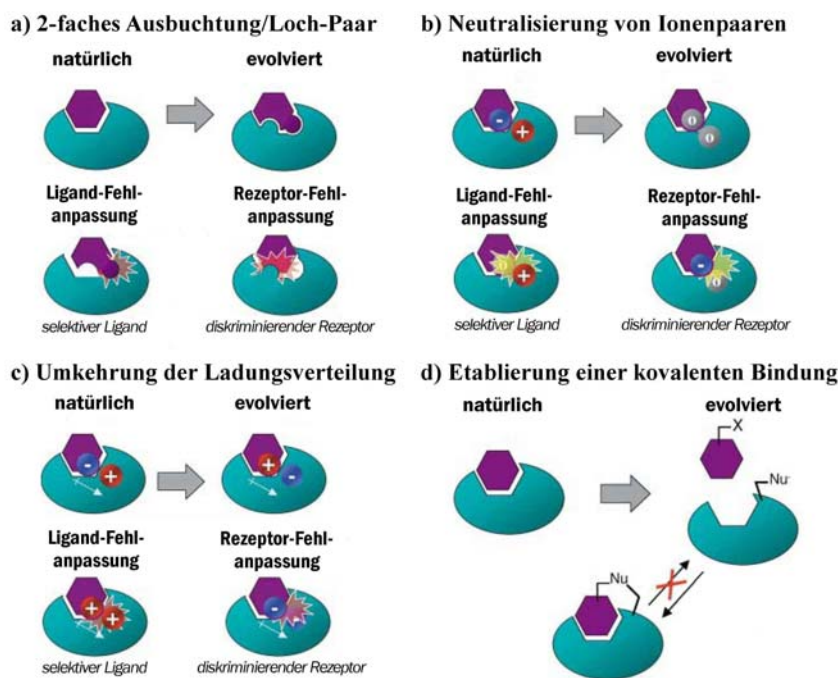


Abbildung 31. Schematische Darstellung von Methoden, die einen gegenüber dem natürlichen Liganden diskriminierenden Rezeptor ermöglichen. a) Der Ligand verfügt neben einer Ausbuchtung auch über ein Loch, das mit einer „Ausbuchtung“ des Proteins korrespondiert. b) Die anziehenden Ladungen von Ligand und Protein werden neutralisiert. c) Das bestehende Ladungspaar wird umgepolt. d) Der Ligand wird über eine kovalente Bindung, die aus einer Reaktion zwischen einem Nukleophil (Nu) und einer Gruppe X resultiert, an das Protein gebunden. (nach [173])

2.1.5. Einführung von *de novo*-Bindestellen

Ganz neue Möglichkeiten zur und Herausforderungen während der Kontrolle von Proteinfunktionalitäten ergeben sich, bei der Generierung von *de novo*-Ligandbindestellen. Diese neuen Positionen zur Bindung organischer Moleküle gehen in der Regel aus Veränderungen bereits vorhandener Kontaktflächen oder rudimentärer Kavitäten hervor, können aber auch künstlich in das Protein eingeführt werden. So zeigte die Arbeitsgruppe Schultz, dass durch Mutationen in der Bindefläche zwischen dem menschlichen Wachstumshormon (hGH) und der extrazellulären Domäne des entsprechenden Rezeptors, die Affinität um den Faktor 10^6 herabgesetzt werden konnte [178]. Die Durchmusterung einer Bibliothek kleiner Liganden auf Basis von Imidazol- und Indol-Gerüsten zeigte, dass 5-Chloro-2-Trichloromethylimidazol die entstandene Kavität am Besten ausfüllt und daher die Affinität zwischen dem mutierten Hormon und der Mutante des Rezeptors um den Faktor 1000 erhöht.

Ein in den letzten zwei Dekaden sehr ausführlich untersuchtes Modellsystem stellt die Kavität dar, die bei Mutation des Leu99 des Lysozyms des Bakteriophagen T4 zu Ala entsteht [179]. Da jene nach dem Lösungsmittel hin abgeschlossene Kavität (bestätigt durch Röntgen-

beugung [179]) im hydrophoben Kern des Lysozyms aufgebaut wurde, besitzt sie vorwiegend apolaren Charakter. Dennoch gelangte durch strukturelle Veränderungen im Grundgerüst des Proteins ein Benzolmolekül in den hydrophoben Kern. Dort füllte es die auf 150 \AA^3 vergrößerte Bindetasche so aus, dass das Volumen des Hohlraumes auf den natürlichen Wert von ca. 30 \AA^3 zurückgeführt werden konnte [180]. Eine Analyse verschiedenster organischer Moleküle zeigte, dass eine Anpassung der Kavität an die Größe und Konformation der Moleküle bedingt möglich sei [181-184]. So kann sich die Bindungstasche auf ein Gesamtvolumen von 245 \AA^3 vergrößern, jedoch ist die Bindung polarer Liganden unmöglich. Weiterhin ergaben die Untersuchungen von Schmelzkurven, dass die Bindung bestimmter Liganden die Struktur des Lysozyms soweit stabilisieren kann, dass die ermittelte Schmelztemperatur um bis zu 6°C anstieg. Außerdem wurde analysiert, ob die Einführung einer polaren Aminosäure (M102Q) einen Einfluß auf die Ligandbindung besäße [183]. Das Ergebnis zeigte, dass jene neue Kavität auch die Bindung einiger polarer Liganden ermöglicht, deren Verbleib in der L99A-Bindestelle nicht beobachtet werden konnte.

Zusammenfassend zeigen beide vorstehend genannten Beispiele, dass die Bindung eines organischen Effektormoleküls in einer neu geschaffenen Bindestelle sich stabilisierend auf das Protein-Gerüst auswirken und daher zur Erhöhung der Aktivität des Proteins beitragen kann. Dies ist aber nur möglich, sofern die Rigidität des hydrophoben Kerns so hoch ist, dass die neu geschaffene Kavität durch die Flexibilität des Proteins nicht kollabiert.

Im Jahre 2004 veröffentlichte die Arbeitsgruppe Matthews eine andersgeartete Mutante des T4 Lysozyms, dessen Schaltung mit Guanidiniumionen weitreichende Folgen für die Protein-Gesamtstruktur offenbarte (Abbildung 32) [185]. Das notwendige Modellsystem entstammte einer früheren Arbeit und besaß eine Insertion der Aminosäuren 40 bis 50 direkt vor der Elternsequenz, die aus denselben Aminosäuren bestand [186]. Da die ursprüngliche Sequenz eine α -Helix bildete, sollte der Frage nachgegangen werden, welche Struktur der verdoppelte Aminosäureabschnitt annehmen würde. Im Ergebnis zeigte sich, dass so viele, wie strukturell tolerierbare, Aminosäuren die ursprüngliche α -Helix verlängerten. Weitere Untersuchungen ergaben, dass der C-Terminus der α -Helix durch die Aminosäuren 63 bis 66 stabilisiert wurde und dass Mutationen dieses Lysozym-Abschnittes zu Gly die Sekundärstruktur der inserierten Aminosäuren soweit destabilisierte, dass nur die Eltern- α -Helix Bestand hatte und sich in ihre ursprüngliche Position zurückbewegte [187]. Die Gesamtheit der vorstehenden Erkenntnisse führte zu der Frage, ob es möglich sei, die großen, strukturellen Veränderungen der Poly-Gly-Mutante mit Hilfe eines molekularen Schalters gezielt herbeizuführen und wieder aufzuheben. So entstand eine Mutante mit einer Veränderung des Arg63 zu Ala [185]. Die

auf diese Weise deletierten, stabilisierenden Interaktionen der Arginin-Seitenkette konnten durch Zugabe von Guanidiniumionen kompensiert werden. Schmelzkurven zeigten eine Destabilisierung des doppelt mutierten Lysozyms um ca. 6°C gegenüber der „Einfach-Mutante“ mit der insertierten α -Helix-Sequenz. Die Zugabe von 0,2 M Guanidinium-Hydrochlorid resultierte in einem Anstieg der Schmelztemperatur um 1,7°C für die „Doppelmutante“. Die Verbesserung der Proteinstabilität durch Ligandenbindung zeigte darüber hinaus, dass bei Anwesenheit des Liganden Leu57 keinen Kontakt mit dem Lösungsmittel besaß, in Abwesenheit jedoch schon. Schließlich konnte in Röntgenstrukturen die aus den Untersuchungen des Jahres 2003 erwartete, strukturelle Veränderung des Proteins, die aus der Ausbildung oder Nichtausbildung der „doppelten“ α -Helix resultierte, gefunden werden. Sie äußerte sich in einer Verschiebung der Eltern-Helix um 20 Å.

Im letzten Beispiel für *de novo*-Bindestellen ist gezeigt worden, dass die Bindung eines organischen Moleküls nicht nur die Seitenkette einer Aminosäure ersetzen kann, sondern dass auch sehr weitreichende Folgen für die Proteingesamtstruktur entstehen können. Außerdem war es möglich, die Veränderungen im Gerüst des Proteins durch Zugabe von Guanidiniumhydrochlorid reversibel zu gestalten.

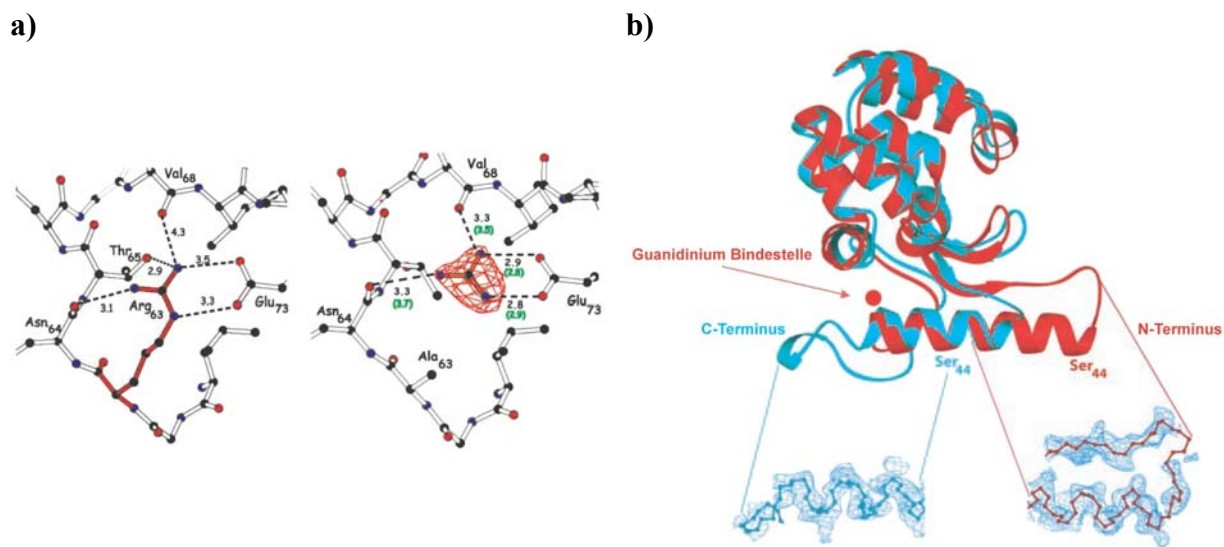


Abbildung 32. Die Bindung eines Guanidiniumions ersetzt die Seitenkette des Arg63 und stabilisiert die Struktur der „doppelten“ α -Helix. a) Kristallstruktur des T4-Lysozyms, die das Binden des Guanidiniumions anstelle der Seitenkette des Arg63 verdeutlicht. b) Struktur des modifizierten T4 Lysozyms: ohne 0,2 M Guanidinium-Hydrochlorid (blau, nur Elternhelix strukturiert); mit Zugabe (rot, beide Helices strukturiert und die Elternhelix wird um 20 Å verschoben). (nach [185])

2.2. Das Modellsystem: Die SH3-Domäne der c-Abl Tyrosin Kinase

2.2.1. Struktur und negative Regulation der c-Abl Tyrosin-Kinase

Die Familie der Abl (Abelson) Tyrosin Kinasen erfüllt in Zusammenarbeit mit Adhäsions- und Wachstumsfaktor-Rezeptoren vielfältige Aufgaben. Sie haben Einfluss auf die Gestaltwandlung (Morphogenese) der Epithelzellen [188, 189], die Zell-Migration und -Chemotaxis [190-192], die F-Actin abhängige Bewegung von Fibroblasten [193, 194], die Axon-Positionierung während ihres Wachstums [195] sowie die Instandhaltung der Dendrit-Verzweigungen [196]. Aufgrund dieses großen Spektrums an Aufgaben ist eine strikte Kontrolle der Kinase-Aktivität unabdingbar.

Das Protoonkogen *ABL1* kodiert im menschlichen Genom für die intrazelluläre c-Abl Nicht-rezeptor Tyrosin Kinase, dem zellulären („c“ steht für *cellular*) Homolog der v-Abl Protein Kinase des Abelson Maus- oder Murinen-Leukämievirus [197]. Strukturell gesehen ist die c-Abl Tyrosin Kinase sehr stark verwandt mit den Kinasen der Src Familie (*sarcoma*, da sie auf Homologen des Onkogens *v-src* des Rous-Sarkom-Virus beruhen [198]) [199, 200]. Die c-Abl Tyrosin Kinase kann in mehrere, funktionale Domänen untergliedert werden (Abbildung 33). In Abhängigkeit des Produktes des alternativen mRNA-Spleißens des transkribierten Gens *ABL1* beginnt das Protein N-terminal entweder mit einer Verlängerung, die ein Myristoylierungssignal trägt (Form 1b) oder sie fehlt (Form 1a), wobei vorrangig die Form 1b in den Zellen gebildet wird [201, 202]. Der Myristoyl-Rest wird an das Gly2 der Cap-Domäne angehängt [203, 204]. C-Terminal zur Cap-Domäne befinden sich die regulatorischen Domänen SH3 [205] und SH2 [206] (Src Homologiedomäne). Hieran schließt sich die Kinase- oder SH1-Domäne an, deren zwei Subdomänen (engl. *N-* und *C-lobe*) über die Aktivierungsschleife (engl. *activation loop*) miteinander verbunden werden [207, 208]. Den C-Terminus bilden Lokalisierungssequenzen für den Zellkern sowie eine DNA- bzw. Aktin-bindende Domäne [209].

Zahlreiche Untersuchungen haben gezeigt, dass normalerweise nur eine geringe Aktivität der c-Abl Tyrosin Kinase in der Zelle vorhanden ist [200, 202, 210]. Dies liegt vor allem an der negativen Regulierung der Kinase-Aktivität, wobei nur die ersten 531 Aminosäuren des gesamten Proteins für diese Aufgabe notwendig sind [211]. Um eine vollständig aktive c-Abl Tyrosin Kinase zu erhalten, muss der Myristoyl-Rest aus seiner Bindetasche im *C-lobe* der Kinase-Domäne delokalisiert werden [212]. Hierdurch wird die Klammer aufgehoben, die die Kombination aus SH2- und SH3-Domäne auf dem Rücken der Kinase-Domäne fixierte. Ein

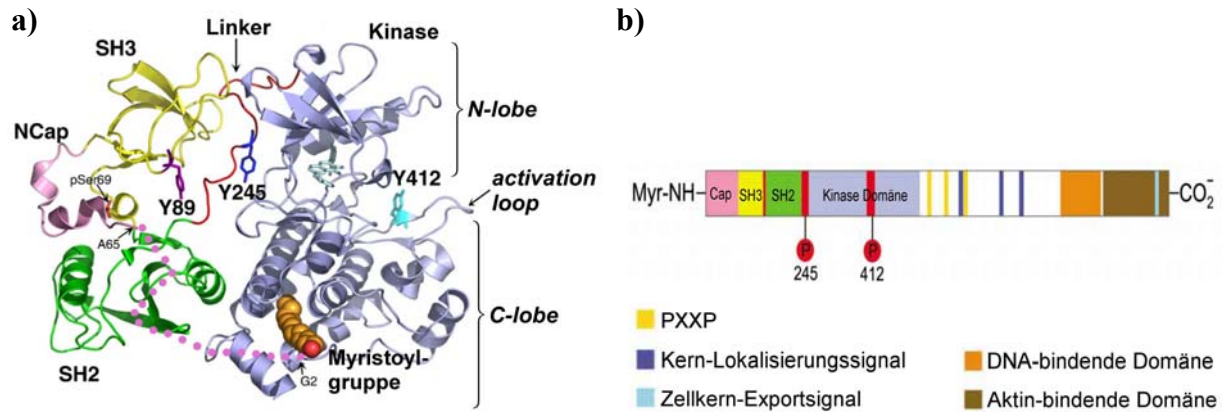


Abbildung 33. Die c-Abl Tyrosinkinase. Kristallstruktur (PDB 2FO0, [212]) (a) und schematische Abfolge der Domänen (b). Der N-Terminus ist myristoyliert; Cap-Domäne in pink; SH3 in gelb; Linker in rot; SH2 in grün; Kinase-Domäne in silbergrau; Region zwischen Gly2 und Ala65 gepunktet, da ihr keine Elektronendichte zugeordnet werden konnte. Das Schema zeigt auch die Abfolge der C-terminalen Domänen. (nach [209, 213])

Umstand, der die Konformation der Kinase-Domäne sehr stark einschränkte. Alternativ kann die SH2-Domäne aus jener Position durch Bindung an ein Phosphotyrosin tragendes Peptid befreit werden. Ein weiteres regulatorisches Element stellt die Bindung der SH3-Domäne an eine Polyprolin-Helix dar, die sich aus der Verbindung von SH2- und Kinase-Domäne bildet. Hierbei wird ebenfalls eine Immobilisierung der Kombination aus SH2- und SH3-Domäne auf der Oberfläche der Kinase-Domäne erreicht. Die Delokalisierung der SH3-Domäne kann auf einfachem Wege durch das Zuführen von Peptiden, die die Struktur einer Polyprolin-Helix annehmen, als Liganden erfolgen. Jedoch bewirkt auch die Phosphorylierung von Tyr89 eine Beendigung der Interaktion der SH3-Domäne mit der natürlichen Polyprolin-Helix. Hingegen scheint nach neuesten Erkenntnissen das früher in diesem Zusammenhang ebenfalls erwähnte Tyr245 auch im phosphorylierten Zustand keine ausschlaggebende Rolle bei der Auflösung der Interaktion zu spielen [213]. Weiterhin hat sich gezeigt, dass die strukturelle Rigidität der Einheit aus SH2- und SH3-Domäne auf Interaktionen mit dem phosphorylierten Ser69 der Cap-Domäne beruhen, das durch die Phosphatgruppe räumlich in die Region zwischen SH2- und SH3-Domäne reicht. Erst wenn sowohl der Myristoyl-Rest delokalisiert als auch die Interaktion zwischen der SH2-, SH3- und Kinase-Domäne aufgehoben worden ist, kann die katalytische Aktivität durch Phosphorylierung des Tyr412 der Aktivierungsschleife initiiert werden.

2.2.2. Untersuchungen der Bindung von Liganden an die Abl SH3-Domäne

Die SH3-Domäne der Abl Tyrosin Kinase besitzt eine sehr wichtige Aufgabe in der Aktivitätsregulation, wie das vorhergehende Kapitel gezeigt hat. Studien von Chen *et al.* bestätigten, dass die Verbindungssequenz zwischen SH2- und Kinase-Domäne schon in Abwesenheit der Kinase-Domäne eine Bindung mit der SH3-Domäne eingeht und dadurch den Komplex aus SH2- und SH3-Domäne aktiv stabilisiert [214]. Ohne den Liganden zeigte die SH3-Domäne große Tendenzen teilweise entfaltet vorzuliegen. Ein Verhalten, das gemäß H/D-Austauschexperimenten mit anschließender ESI-MS-Untersuchung bei Bindung der Verknüpfungssequenz oder eines künstlichen Peptids nicht auftrat. Darüber hinaus ist die Bindung der Verknüpfungssequenz durch die Abl SH3-Domäne in Konstrukten ohne Kinase-Domäne ein besonderer Vorgang, da er in Kontrolluntersuchungen mit anderen SH3-Domänen von Kinasen der Src-Familie nicht beobachtet werden konnte. Aus den vorstehend genannten Gründen wurde bereits 1992 damit begonnen, nach natürlichen sowie synthetischen Liganden der Abl SH3-Domäne zu suchen, um diese Art der Aktivitätskontrolle besser zu verstehen. Arbeiten mit verkürzten Varianten des Bindungspartners 3BP-1 der SH3-Domäne [215] und Phagen-Display mit einer 12 Aminosäuren umfassenden Bibliothek [216] führten zur Ausbildung der ersten aus 10 Aminosäuren bestehenden Konsensus-Sequenz XPXXPPPΨPP (X: alle Aminosäuren, P: Pro und Ψ: hydrophobe Aminosäure). Die Konsensus-Sequenz bestätigte die vorher aufgestellte Behauptung, dass die Proline 2, 7 und 10 [215] bzw. schließlich das Strukturmotiv einer Typ II Poly-Prolin-Helix [217] wichtig für die Bindung seien. Weitere Erkenntnisse im Hinblick auf Verbesserungen der Peptidliganden brachte die 1994 veröffentlichte Kristallstruktur des Komplexes aus 3BP-1 und der Abl SH3-Domäne (Abbildung 34) [218].

Diese Kristallstruktur in Kombination mit einem eigenen Computermodell der Bindestelle [219] veranlassten die Arbeitsgruppe Serrano in einem rationalen Ansatz ca. 50 Aminosäuresequenzen zu untersuchen. Die systematische Veränderung einzelner Aminosäuren des Liganden ergab schließlich zwei Peptide, die beide einen K_d -Wert von 2 μ M gegenüber der Abl SH3-Domäne aufwiesen [220]. Ihre Sequenzen lauteten APTYPPPPPP (p7) und APTYSPPP LPP (p17). Aus der Kristallstruktur (Abbildung 34) konnte abgeleitet werden, dass die Bindung der Liganden unter Einbeziehung der RT- und der n-Src-Schleife an drei wenig ausgeprägten Bindetaschen stattfand. Deshalb war die Unterteilung der Peptide in zwei Bereiche möglich. Zum einen in den N-terminalen Bereich, der die Orientierung des Liganden be-

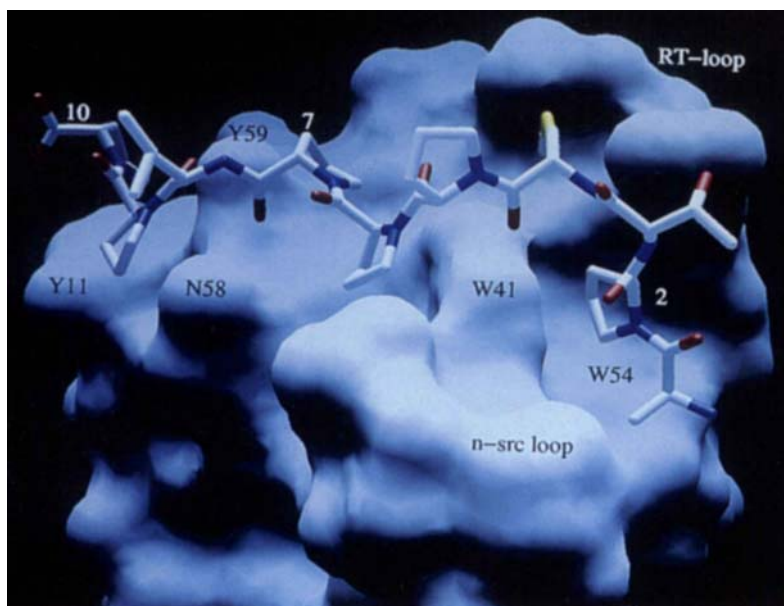


Abbildung 34. Kristallstruktur der Bindung des Prolin-reichen Peptids 3BP-1 an die Oberfläche der c-Abl SH3-Domäne. (nach [218])

züglich der SH3-Domäne bestimmt, und zum anderen in den C-terminalen Bereich, der die Poly-Pro-Helix ausbildet, die mit zwei der Bindetaschen auf der hydrophoben Oberfläche der SH3-Domäne interagiert. Aufgrund dieser Überlegungen resultierte aus der Kombination der besten Peptide der ersten Selektion das Peptid p40 (APTYSPPPPP) [220]. Es wies gegenüber der Abl SH3-Domäne einen K_d -Wert von $0,4 \pm 0,1 \mu\text{M}$ auf.

Die 1998 veröffentlichte Kristallstruktur (Abbildung 35) aus dem Komplex des Liganden p41 (APSYSPPPPP, $K_d = 1,5 \mu\text{M}$) mit der Abl SH3-Domäne konnte schließlich die hohe Bindungsaffinität erklären [221]. Die Aminosäure an Position 4 vermittelt die Spezifität der Orientierung des Liganden. Bei der Abl SH3-Domäne befindet sich an der Position die mit Aminosäure 4 des Liganden interagiert die neutrale Aminosäure Thr, weshalb aromatische Aminosäuren an Position 4 im Peptid favorisiert werden. Phagen-Display-Studien weisen für Position 4 auch vorrangig Tyr [216, 222] oder Trp [223] aus. Hinsichtlich der Orientierung des Liganden sind bei SH3-Domänen in der Regel zwei Klassen bekannt. Dies beruht auf der Interaktion eines Asp der SH3-Domäne mit einem Arg oder Lys an der Spezifitätsposition des Liganden, die sowohl am N- als auch am C-Terminus auftreten kann. Ist ihre Lage auf den N-Terminus festgelegt, liegt ein Ligand der Klasse I vor, im umgekehrten Fall muss das Peptid der Klasse II zugeordnet werden [224]. Der Fall der Bindung eines Liganden mit einer aromatischen Aminosäure an Position 4 an eine Abl SH3-Domäne wird analog zu Klasse I-Peptiden behandelt.

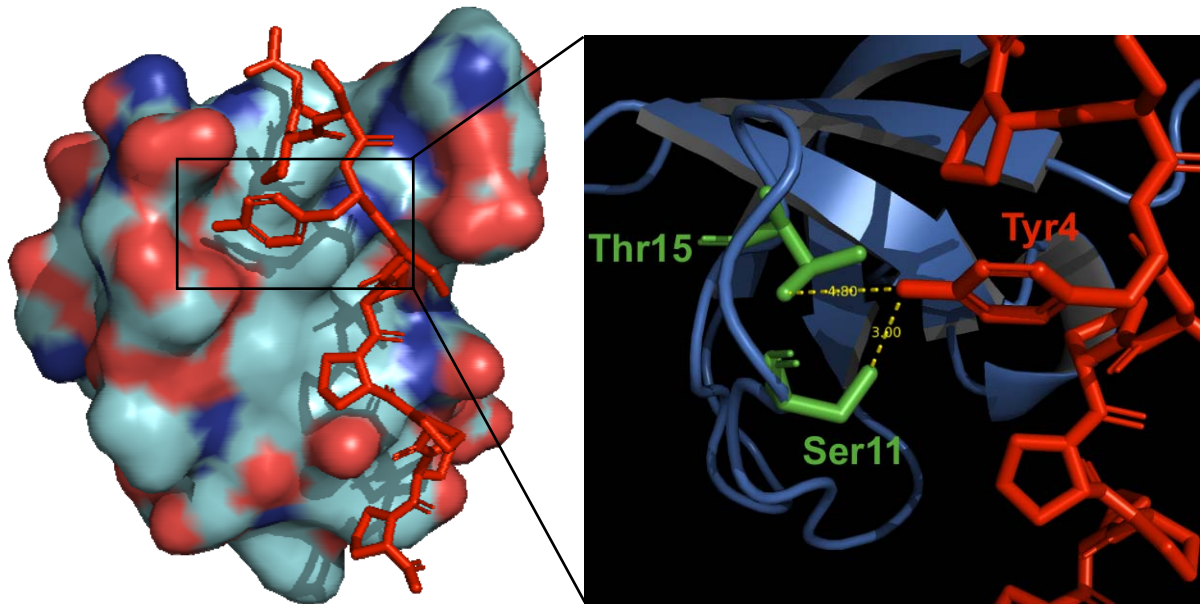


Abbildung 35. Bindung des Peptids p41 an die Oberfläche der c-Abl SH3-Domäne. Vergrößert dargestellt sind die Wasserstoff-Brücken von Ser15 und Thr19 der SH3-Domäne zu Tyr4 des Peptids p41. Peptid p41 in rot; SH3-Domäne in blau; Ser15 und Thr19 in grün. (PDB 1BBZ, [221]; erstellt mit Pymol [225])

Das Auftreten eines Tyr anstelle des vorher favorisierten Met [226] kann auch mit den möglichen Wasserstoffbrücken (H-Brücken) zu Ser11 und dem bereits genannten Thr15 erklärt werden. Außerdem zeigte die Mutation Thr15Asp eine 12-fache Verschlechterung in der Bindungsaffinität der SH3-Domäne [222]. An Position 5 besitzt p40 ein Ser anstelle des aus 3BP-1 abgeleiteten Pro [216, 222, 223, 227]. Dies könnte eine H-Brücke zu Glu34 zur Ursache haben.

2.2.3. Mögliche Evolution des Ligandbindemotivs

Anhand der Abl SH3-Domäne und 5 Mutanten der Aminosäuren Thr15, Asn30 und Trp46 sollte mittels Phagen-Display von Peptiden aus 9 Aminosäuren gezeigt werden, wie sich die Ligandensequenzen von Abl zur Src SH3-Domäne veränderten, so dass Liganden der Abl SH3-Domäne nicht an Src banden und umgekehrt [228]. Über die Zwischenstufen der Aminosäuresequenzen DNW und DCW konnte das Ligandbindemotiv aus Thr15, Asn30 und Trp46 der Abl SH3-Domäne in DCV der Src SH3-Domäne umgewandelt werden. Hierbei veränderten sich die einzelnen Konsensussequenzen der Liganden nach je 3 Runden Phagen Display wie folgt: PTYPPLPP (Abl) zu pxΦxpPxpP (TNW) zu RpxPxxP (DNW) zu RxLPxxP (DCW) zu RPLPxxP (DCV) zu RPLPTLP (Src) (90% der Peptide: Großbuchstaben, >50%:

kleine Buchstaben, x: alle Aminosäuren, Φ : aromatische Aminosäure). Bei Betrachtung der Evolution der Konsensussequenz des Liganden, fällt sofort auf, dass die Thr15Asp-Mutation in der SH3-Domäne eine Umwandlung der aromatischen Aminosäure des Liganden in Arg bewirkt. Die Asn30Cys-Mutation der SH3-Domäne ermöglicht die Positionierung eines Leu im Peptidliganden und schließlich wird durch die Trp46Val-Mutation innerhalb des Proteins noch die Einführung eines weiteren Pro in die Konsensussequenz des Liganden erreicht.

2.2.4. SH3-Domänen als Modellsysteme für den hydrophoben Kern von Proteinen

Die Stabilität von Enzymen wird im Hinblick auf Aspekte der Proteinfaltung in der Grundlagenforschung untersucht, aber auch die Industrie hat im Bezug auf den katalytischen Einsatz ein praktisches Interesse an der Robustheit von Proteinen, da hierdurch nicht selten die Aktivität beeinflusst wird [229]. Im Rahmen der Behandlung dieses Themenkomplexes wurden u. a. viele Vertreter der Familie der SH3-Domänen untersucht [230-232]. Die hohe Strukturhomologie in den unterschiedlichen Arten von SH3-Domänen und ihre hohe Verbreitung als steuerndes Element nicht nur in Proteinkinasen sondern auch in Lipasen, GTPasen, Adaptorproteinen und vielen anderen macht sie zu einem interessanten Studienobjekt. SH3-Domänen bestehen in der Regel aus ca. 60 Aminosäuren, die fünf β -Faltblätter, drei Schleifenregionen und eine 3_{10} -helikale Struktur ausbilden. Je zwei der fünf β -Faltblätter sind zueinander antiparallel angeordnet und über eine Schleife miteinander verbunden. Aus jener Struktur geht ein sehr kompakter hydrophober Kern hervor, der Schmelztemperaturen von 70 bis 80°C hervorruft. Untersuchungen des hydrophoben Kerns ähnlich kleiner Proteine, nämlich der Barnase (Ribonuklease aus *Bacillus amyloiquefaciens*, 110 Aminosäuren) bzw. des Chymotrypsin-Inhibitors 2 (64 Aminosäuren), haben gezeigt, dass Proteinstrukturen in zwei Arten auf Mutationen von Aminosäuren des hydrophoben Kerns reagieren können [233, 234]. Zum einen kann die in der Literatur angewandte, nicht destruktive Mutation einer sterisch anspruchsvollen Aminosäure zu einer weniger Raum benötigenden Aminosäure eine neue Kavität schaffen bzw. eine bereits Bestehende vergrößern. Zum anderen kann das Protein eine Umfaltung der Struktur eingehen, so dass das Volumen der Kavität entscheidend verkleinert wird. Die Art der Reaktion des Proteingerüsts hängt maßgeblich von zwei Faktoren ab. Zum einen entscheidet die Rigidität der Aminosäureseitenketten des hydrophoben Kerns über die Art der Anpassungsreaktion, zum anderen besitzt auch die Art der Sekundärstruktur, der die

zu verändernde Aminosäure entstammt, einen Einfluss. In jenem Zusammenhang haben Arbeiten mit der strukturell verwandten Fyn SH3-Domäne gezeigt, dass der hydrophobe Kern sensitiv auf Mutationen an ihn bildenden Aminosäuren reagiert [232]. Allerdings konnten im Falle der Fyn SH3-Domäne sowohl experimentell [232] als auch *in silico* [235] kompensierende Mutationen identifiziert werden, die den hydrophoben Kern erneut weitestgehend stabilisierten.

2.3. Aufgabenstellung: Eine schaltbare c-Abl SH3-Domäne (Projekt 1)

Unter Zuhilfenahme der Erkenntnisse des vorhergehenden Kapitels sollte im ersten Projekt der vorliegenden Doktorarbeit eine durch Zugabe organischer Moleküle schaltbare SH3-Domäne der c-Abl Tyrosin Kinase entwickelt werden. Dieses Ziel sollte in mehreren Abschnitten erreicht werden (Abbildung 37). Der erste Abschnitt bestand in der teilweisen Destabilisierung des hydrophoben Kernes durch eine Mutation von Alanin an Position 4 (Nummerierung der Aminosäuresequenz gemäß Literatur [236], Seite 262) (Abbildung 36) in eine sterisch anspruchsvolle, hydrophobe Aminosäure wie z. B. Valin, Phenylalanin, Tyrosin

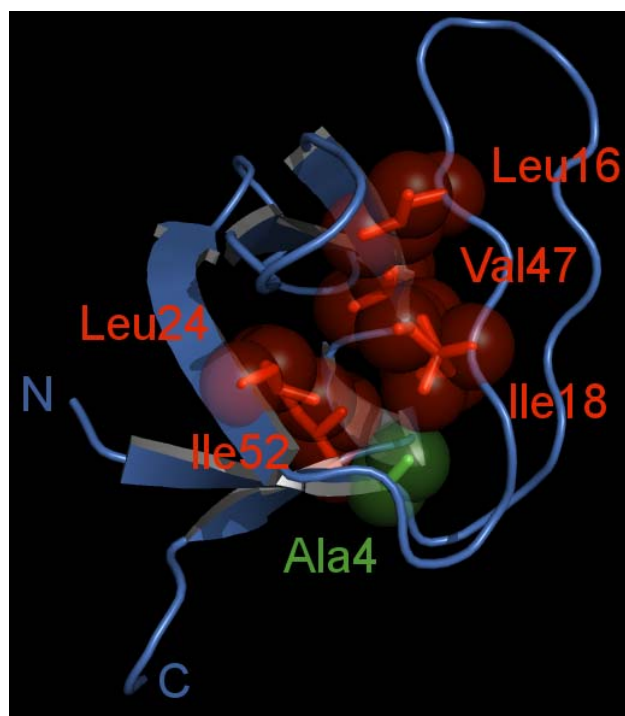


Abbildung 36. Struktur der c-Abl SH3-Domäne mit den Aminosäuren, die den hydrophoben Kern bilden. SH3-Domäne in blau; Aminosäuren mit raumerfüllender Struktur dargestellt. (erstellt mit Pymol [225])

oder Tryptophan (①). Im darauffolgenden Schritt (②) sollte der für die neue Aminosäure im hydrophoben Kern notwendige Platzbedarf mittels Durchführung mehrerer Runden einer Proteinevolutionsmethode mit der SH3-Domäne geschaffen werden. Nach Erreichen dieses Zieles sollte eine Rückmutation (③) in eine kleine, hydrophobe Aminosäure, wie z. B. Glycin oder Alanin, stattfinden. Durch jenen Schritt sollte eine neue, künstliche Kavität im hydrophoben Kern der SH3-Domäne entstehen, die, wie zahlreiche Untersuchungen künstlich geschaffener Hohlräume zeigten, mit hoher Wahrscheinlichkeit zumindest teilweise kollabieren könnte. Damit wären alle Voraussetzungen erfüllt, um ein als Schalter fungierendes, organisches Molekül einzusetzen. Es sollte durch Bindung in der künstlichen Kavität, die im Laufe der Rückmutation deletierten van-der-Waals-Kontakte und Wasserstoffbrücken, erneut in dem hydrophoben Kern ausbilden und ihn somit in seiner Struktur stabilisieren (④).

Der Ersatz einer durch Mutation entfernten Aminosäureseitenkette durch ein organisches Molekül als Platzhalter wurde in der Literatur mehrfach angewandt (exemplarisch sei hier auf das in Kapitel 2.1.5 erwähnte T4-Lysozym hingewiesen). Ebenfalls am T4-Lysozym hat die Arbeitsgruppe Matthews gezeigt, dass die Bindung eines organischen Moleküls eine neu geschaffene Kavität stabilisieren kann [180]. Beiden Beispielen ist jedoch gemein, dass die Position der Mutation rationellen Überlegungen z. T. mit Unterstützung durch Kristallstrukturen entstammt. Der Ansatz dieser Arbeit hingegen eröffnet die theoretische Möglichkeit die Mutationsposition frei zu wählen, da diese für die kompensierende Mutation(en) aus der nachfolgend durchgeführten Proteinevolution ohne Bedeutung ist. Daher muss der Prozess der Auffindung einer stabilisierten, aktiven Mutante durch die Proteinevolution als äußerst wichtiger Teilschritt im Hinblick auf die Etablierung einer *de novo*-Ligandbindestelle in der Struktur eines Proteins angesehen werden. Allerdings muss auch darauf hingewiesen werden, dass die Flexibilität der Proteinstruktur von entscheidender Bedeutung für das Gelingen der Proteinevolution ist. In diesem Zusammenhang haben im hydrophoben Kern neu geschaffene Kavitäten, die durch die Rigidität der Aminosäureseitenketten des hydrophoben Kerns nicht kollabieren, einen sehr hohen destabilisierenden Effekt auf das Protein [233]. Außerdem muss für das Zielprotein in dem die *de novo*-Bindestelle generiert werden soll, ein Assay existieren, der während der Proteinevolution eine Selektion auf intakte Proteine ermöglicht.

Im Falle der SH3-Domäne sollte die Kontrolle auf Veränderungen im hydrophoben Kern aufgrund von Untersuchungen der Ab- bzw. Zunahme der Bindungsaffinität an das Peptid p40 [220] durchgeführt werden. Denn es wurde angenommen, dass die weitreichende Mutation im hydrophoben Kern dieses sehr kompakten Proteins sich umfassend auf die Struktur der Proteinoberfläche und daher auch auf die p40-Bindung auswirken würde. Zusammenfassend

sollte durch das erwähnte und in Abbildung 37 skizzierte schrittweise Vorgehen die Entwicklung einer durch ein organisches Molekül anschaltbaren SH3-Domäne möglich sein. Wobei der „Einschalt-Vorgang“ in der Stabilisierung der Protein-Struktur durch Bindung des organischen Moleküls in der künstlich geschaffenen Kavität bestünde.

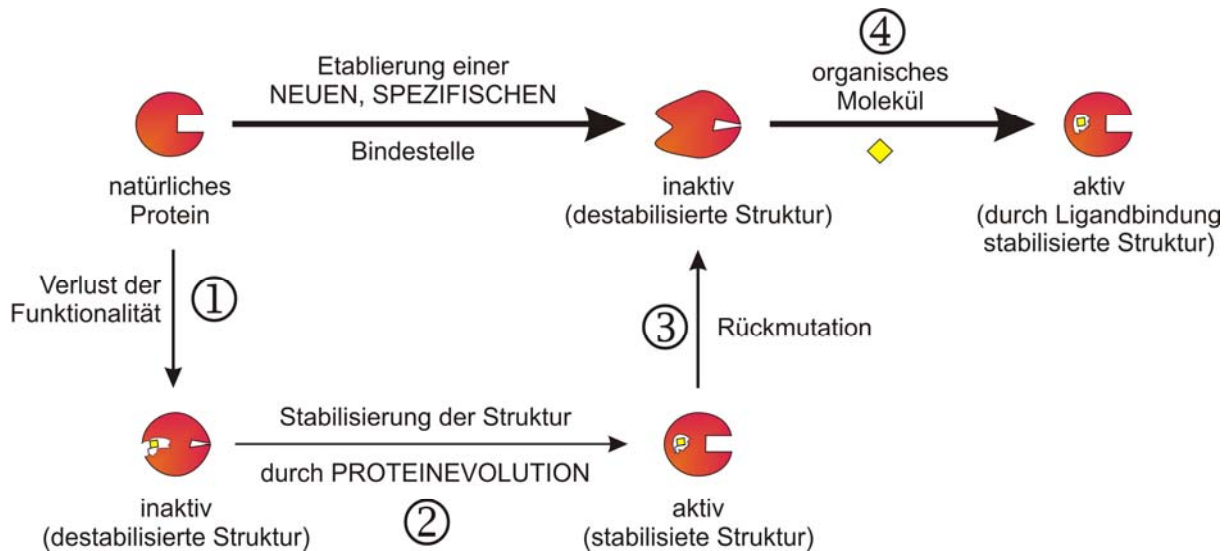


Abbildung 37. Schematischer Ablauf der einzelnen Projektphasen und der zu erreichenden Ergebnisse, um eine künstliche Ligand-Bindestelle in der Proteinstruktur der SH3-Domäne zu etablieren. Durch die Mutation einer kleinen in eine sterisch anspruchsvolle Aminosäure wird die Struktur des Proteins destabilisiert (①). Mit Hilfe der Proteinevolution werden kompensierende Mutationen gesucht (②). Nach erfolgreicher Selektion wird die sterisch anspruchsvolle Aminosäure in Ala oder Gly zurückmutiert (③). Das erneut destabilisierte Protein wird durch Bindung eines organischen Moleküls strukturell stabilisiert (④).

3. Materialien zu Projekt 1

3.1. Verwendete Geräte

Tabelle 1. Auflistung der verwendeten Geräte.

Gerät	Hersteller	Typbezeichnung
Agarose-Horizontalgel-elektrophoresekammern	PEQLAB	Perfect Blue Gelsystem M und L
Analysenwaagen	Mettler Sartorius	PM400 Basic
Anzentrifuge	Harmony	MCF-2360
Autoklav	Thermo Fisher Scientific	Varioklav 135 S
CD-Spektrometer	Jasco	J-810
Digitalkamera	Canon	PowerShot G5
Elektroporator	Biorad	MicroPulser
Emulsifier	Avestin	Emulsiflex-C5
Fluoreszenz-Spektrometer	Jasco	FP-6500 mit Temperatur-regler ETC-273T
FPLC-System	GE Healthcare	ÄKTA prime plus
Gefrierschrank -80°C	New Brunswick Scientific	ultra low temperature freezer
Gefriertrockner	Christ	LT-105 Alpha 2-4 LSC
Heizblock	Biometra Eppendorf	ThermoShaker TS1 Thermomixer comfort ThermoStat plus
HPLC (analytisch)	Agilent Technologies	1100 Serie mit der Säule - Eclipse XDB-C18 3,5 µM - Zorbax 300SB-C3
HPLC (präparativ)	Varian	Prostar Serie mit der Säule - Microsorb 300-5 C18
Inkubationsschüttler	New Brunswick Scientific Infors	I26, TC-7 HT Aerotron
Inkubationsschrank	Memmert	UFB 400 INE 800
Magnetischer Separatorstand	Chemagen	Chemagic stand 2x12
MALDI-TOF	Bruker Daltonics	Autoflex II

Gerät	Hersteller	Typbezeichnung
Mikrowelle	Sharp	R-933
Nassblotapparatur	Biorad	Mini Trans-Blot Cell
Netzgerät	Biorad	PowerPac Basic
OD ₆₀₀ -Messgerät	GE Healthcare	Ultrospec 10
PCR-Thermocycler	Biometra	Tpersonal
Peptidsynthesizer	Advanced ChemTech	APEX 396
	Multisyntech	Syro XP
pH-Meter	Hanna Instruments	pH 211
Pipetten	Eppendorf	Reference Research
Reinstwasseranlage	Millipore	Milli-Q Advantage A10
Roller	New Brunswick Scientific	TC-7
	LaboBrand	L 28
Rotoren	FiberLite	F8 F10
	Sorvall	SS-34
Scanner	Canon	CanoScan 8400F
Horizontal-Schüttelgerät	Heidolph	Promax 1020
SDS-Vertikalgel- elektrophoresekammer	BioRad	Mini-PROTEAN
Sterile Werkbank	Nuaire	NU 440-500E
Taumler	Heidolph	Polymax 1040
Ultraschallbad	Bandelin	Sonorex Digitec
UV-Schirm	H. Saur	Transilluminator IL-200-M
UV/VIS-Spektrometer	GE Healthcare	Ultrospec 3100 pro
Vakuumpumpe	KNF Neuberger	Laboport SR
Vortexer	Harmony	VTX-3000L
Wasserbad	P-D Industriegesellschaft	WB20
Zentrifugen	Eppendorf	5415 D 5702 R
	Hettich	Mikro 20

3.2. Chemikalien, Enzyme und Verbrauchsmaterialien

Die in Tabelle 2 nicht genannten Chemikalien wurden in p. A.-Qualität von *Appllichem* (Darmstadt, Deutschland), *Roth* (Karlsruhe, Deutschland) oder *Sigma-Aldrich* (München, Deutschland) bezogen. Als Lieferanten für Verbrauchsmaterialien dienten vorrangig *Fleischhacker* (Schwerte, Deutschland), *Sarstedt* (Nümbrecht, Deutschland) und *VWR* (Darmstadt, Deutschland).

Tabelle 2. Auflistung verwendeter Chemikalien, Enzyme und Verbrauchsmaterialien sowie ihrer Hersteller.

Hersteller	Produkte
Acros Organics (New Jersey, USA)	Imidazol, N-Methylmorpholin
Agilent Stratagene (La Jolla, USA)	GeneMorph II Random Mutagenesis System, Turbo-Pfu-Hotstart-Polymerase
Alfa Aesar (Karlsruhe, Deutschland)	Raffinose
AppliChem (Darmstadt, Deutschland)	Ampicillin, BSA, H ₂ O ₂ , IPTG, Isopropanol, Kanamycin, Tris, Trypton, X-Gal
BD Biosciences (Franklin Lakes, USA)	Bacto-Agar, Bacto Hefe-Stickstoffbase
Biosolve (Valkenswaard, Niederlande)	DMF
Calbiochem (Darmstadt, Deutschland)	Sulfobiotin-X-NHS-Reagenz
Clontech-Takara Bio Europe (Saint-Germain-en-Laye, Frankreich)	Matchmaker LexA Hefe-2-Hybridsystem
Deutsche Hefewerke (Nürnberg, Deutschland)	Hefeextrakt
Eurofins MWG Operon (Ebersbach, Deutschland)	Oligonukleotide
Eurogentec (Köln, Deutschland)	Agarose
Fermentas (St. Leon-Rot, Deutschland)	DNA- und Protein-Marker, dNTPs, DTT, GeneJet™ Plasmid Miniprep Kit, Restriktionsenzyme und -puffer, T4-DNA-Ligase
Fluka (Neu Ulm, Deutschland)	5,6-Carboxyfluorescein, β-Mercaptoethanol, Phenol
GE Healthcare (München, Deutschland)	ECL Western-Blotting System, Hyperfilm ECL Autoradiographie Film, M13-Phagen Detektions Modul, Ni-Sepharose 6 fast flow, Streptavidin/HRP-Konjugat, HiLoad 16/60 Superdex 75-Gelfiltrationssäule
Halocarbon (New Jersey, USA)	TFA

Hersteller	Produkte
IBA (Göttingen, Deutschland)	Desthiobiotin, Streptactin-Sepharose
KNF optichem (Lohmar, Deutschland)	Acetonitril
Kodak (Stuttgart, Deutschland)	Developer D-19
Merck (Darmstadt, Deutschland)	Glukose, SDS, Di-Natriumhydrogen-phosphat-Dihydrat, Natriumhydroxid
Millipore (Carrigtwohill, Irland)	Dialysemembran (Poren-Ø 0,025 µm), Immobilon P-PVDF-Membran
MoBiTech (Göttingen, Deutschland)	Anti-pIII-Antikörper
MultiSynTech (Witten, Deutschland)	HBTU
New England Biolabs (Schwalbach, Deutschland)	Anti-MBP-Antikörper, Amylose-Matrix, DNA-Marker, Phusion-Polymerase
Novabiochem (Darmstadt, Deutschland)	Fmoc-geschützte Aminosäurebausteine, Harze
Novagen (Darmstadt, Deutschland)	KOD-Hot Start Polymerase-PCR-Kit
Promega (Mannheim, Deutschland)	Streptavidin MagneSphere Paramagnetic Particles, Trypsin (sequ. Grade)
Qiagen (Hilden, Deutschland)	Ni ²⁺ -NTA-Superflow, Plasmidpräparations-kit QIAquick Spin Säule, QIAquick Gel Extraction und PCR Purification Kit, Penta-His-Antikörper
Roth (Karlsruhe, Deutschland)	Acrylamid-Lsg. Rotiphorese-Gel 30, Agar, APS, Bromphenolblau, Coomassie Brilliant Blau R250, Chloramphenicol, Citronensäure, Dialyseschlauch (MWCO:15 kDa), Ethidiumbromid, Milchpulver, ONPG, PEG 8000, Roti-PVDF-Membran, TEMED, Triton X-100, Tween 20
Sarstedt (Nümbrecht, Deutschland)	Sterilfilter (45 nm)
Sartorius (Göttingen, Deutschland)	Viva-Spin-Säulen (MWCO: 5, 10, 30 und 50 kDa)
Sigma-Aldrich (München, Deutschland)	Aminosäuren für Hefe-Medien, Anti-c myc-Antikörper, Biotin, DIPEA, Ethandithiol, Galaktose, Glaskügelchen (425-600 µm), Heringssperma-DNA, Piperidin, Thioanisol, Trypsin
Spectrum Laboratories (Rancho Dominguez, USA)	Dialyseschlauch Spectra/Por 7 (MWCO: 50 kDa, regenerierte Cellulose)
Whatman (Maidstone, England)	Nitrocellulosefilter (BA 85, 0.45 µm, Ø 82 mm), Whatman Filterpapier

3.3. Verwendete Plasmide

3.3.1. pET16b

Der pET16b-Vektor (5711 bp) der Firma *Novagen* ermöglicht eine N-terminale Fusion eines His₆-tags mit nachgelagerter Faktor Xa Protease-Schnittstelle an das Zielprotein. Die Expression des Fusionsgens unterliegt einem starken T7-Promotor, der durch den lac-Repressor (*lacI*) bis zur Zugabe von IPTG inhibiert wird. Das Plasmid vermittelt durch das *bla*-Gen eine Ampicillin-Resistenz und wird über den ColE1 Replikationsursprung aus pBR322 vervielfältigt.

3.3.2. pTrc99a

Aus dem Plasmid pKK233-2 entwickelte die Firma *Pharmacia* (heute *GE Healthcare*) den pTrc99a-Vektor (4176 bp). Die Expression über den *trc*-Promotor wird über das *lacI*-Gen reguliert und benötigt 1 mM IPTG zur Induktion der Genexpression. Weitere Bestandteile des Vektors sind die Terminatorsequenzen *rrnB* T1 und T2, das *bla*-Gen sowie der Replikationsursprung ColE1 aus pBR322.

3.3.3. pGILDA

Im Matchmaker Hefe-2-Hybridsystem entstammt das Hybrid mit der DNA-bindenden Domäne LexA dem pGILDA-Vektor (6570 bp) der Firma *Clontech*. Die Proteinexpression in Hefe unterliegt dem *GALI*-Promotor, der nur in Gegenwart von Galaktose aktiv ist und dessen Expression durch Glukose unterdrückt werden kann. Der Shuttlevektor nutzt in Hefe als Selektionsmarker das *HIS3*-Gen (Imidazolglycerolphosphat-Dehydratase) und vermittelt in *E. coli* eine Ampicillin-Resistenz. Deshalb besitzt er den Replikationsursprung CEN/ARS für Hefe und ColE1 für *E. coli*.

3.3.4. pB42AD

Das zweite Hybridprotein wird durch den pB42AD-Vektor (6449 bp) von *Clontech* gebildet, der die N-terminale Fusion an die Zellkern-Lokalisationssequenz SV40, die Aktivator-domäne B42 und einen HA-tag kodiert. Die Genexpression unterliegt der Kontrolle des *GAL1*-Promotors. Den Selektionsmarker bildet in Hefe das *TRP1*-Gen (N-(5'-Phosphoribosyl)-anthranilat-Isomerase) und in *E. coli* Ampicillin. Die notwendigen Replikationsursprünge bilden 2 μ (Hefe) und pUC (*E. coli*).

3.3.5. p8opLacZ

Eines der beiden Reportersysteme des Hefe-2-Hybridexperimentes bildet der p8opLacZ-Vektor (10484 bp) von *Clontech*. Er reguliert über eine 8-mal vorhandene LexA-Operatorstelle die Expression der von *lacZ* kodierten β -Galaktosidase. Außerdem sind auf dem Shuttlevektor der Selektionsmarker *URA3* (Orotidin-5'-Phosphat-Decarboxylase), ein Ampicillin-Resistenzgen und die Replikationsursprünge 2 μ und ColE1 vorhanden.

3.4. Mikroorganismen

3.4.1. *Escherichia coli*-Stämme

Stamm	Genotyp
DH5 α	F ⁻ Φ 80 Δ <i>lacZ</i> Δ M15 Δ (<i>lacZYA</i> -argF) U169 <i>deoR recA1 endA1 hsdR17</i> (r _K ⁻ , m _K ⁺) <i>phoA supE44</i> λ ⁻ <i>thi-1 gyrA96 relA1</i>
TOP10	F ⁻ <i>mcrA</i> Δ (<i>mrr-hsdRMSmcrBC</i>) Φ 80 <i>lacZ</i> Δ M15 Δ <i>lacX74 recA1 ara</i> Δ 139 Δ (<i>ara-leu</i>)7697 <i>galU galK rpsL</i> (Str ^R) <i>endA1 nupG</i>
BL21(DE3)	F ⁻ <i>ompT hsdS_B</i> (r _B -m _B -) <i>gal dcm</i> (DE3)
BL21-Gold(DE3)	<i>E. coli</i> B F ⁻ <i>dcm</i> ⁺ Hte <i>ompT hsdS</i> (r _B - m _B -) <i>gal</i> λ (DE3) <i>endA Tet</i> ^R
KC8	<i>hsdR leuB600 trpC9830 pyr::Tn5 hisB463 lac</i> Δ X74 <i>strA galU galK</i>

3.4.2. *Saccharomyces cerevisiae*-Stamm

Stamm	Genotyp
EGY48	MAT α LEU::LexA _{op(x6)} -LEU2 ura3 his3 trp1 GAL ⁺

3.5. Medien

3.5.1. Medien zur Anzucht von *E. coli*-Kulturen

In der Regel erfolgte die Anzucht von Bakterienkulturen in autoklaviertem Luria-Bertani-Medium (LB-Medium). Zur Plasmidvereinzelung in KC8-Zellen wurde M9 Minimalmedium verwendet.

LB-Medium:

- 10 g/L Bactotrypton
- 5 g/L Hefeextrakt
- 5 g/L NaCl
- pH 7,0

M9 Minimalmedium:

- 100 mL/L 10x M9 Salz-Lösung
- 128 g/L Na₂HPO₄ · 7 H₂O
- 30 g/L KH₂PO₄
- 5 g/L NaCl
- 5 mM MgSO₄
- 0,1 mM CaCl₂
- 22 μ M FeCl₃ *
- 0,4% (w/v) Glukose *
- 0,1% (v/v) NH₄Cl
- 0,01% (v/v) Thiamin HCl *
- ad 1 L ddH₂O

* erst nach dem Autoklavierprozess hinzugefügt

Alle während des Autoklavierens instabilen Substanzen wurden den Medien, sobald sie auf 50°C abgekühlt waren, als sterilfiltrierte Lösungen hinzugefügt. Dies gilt insbesondere für die verwendeten Antibiotika, deren Endkonzentrationen im Medium 100 µg/mL für Ampicillin, 34 µg/mL für Chloramphenicol und 50 µg/mL für Kanamycin betrugen. Im Falle des M9 Mediums wurde neben den Antibiotika noch eine Lösung bestimmter Aminosäuren (*dropout*-Lösung) zugesetzt. War die Bildung von Festmedium beabsichtigt wurde das Medium vor dem Autoklavieren mit 1,5% (w/v) Agar vom Typ Kobe I versetzt.

3.5.2. Medium zur Anzucht von *S. cerevisiae*-Kulturen

Um zu gewährleisten, dass Plasmide ständig in den Hefezellen anwesend sind, wurden Hefen immer in den entsprechenden Standardmedien (SD-Medium) kultiviert. Hierbei wurden dem autoklavierten Medium nach Abkühlen auf ca. 50°C Lösungen von bestimmten Aminosäuren (*dropout*-Lösung) zugesetzt. Die Auswahl der infrage kommenden Aminosäuren richtete sich nach den auf den Plasmiden kodierten Auxotrophiemarkern und sollte die mit den dortigen Biosynthesewegen verknüpften Aminosäuren nicht umfassen. Im Falle von Festmedium-Platten musste ca. 3,4% (w/v) an Bacto-Agar genutzt werden.

SD-Medium: 5,0 g/L (NH₄)₂SO₄
 1,7 g/L Hefe-Stickstoffbase
 100 mL/L entsprechende 10x *dropout*-Aminosäure-Lösung *
 2% (w/v) Glukose *
 oder 2% (w/v) Galaktose * und
 1% (w/v) Raffinose *
 ad 1 L ddH₂O
 pH 5,8

* erst nach dem Autoklavierprozess hinzugefügt

Substanzen, die hitzeempfindlich sind, wurden als sterilfiltrierte Lösungen bei einer Temperatur von ca. 50°C nachträglich dem Medium hinzugefügt und anschließend auf das gewünschte Volumen mit ddH₂O aufgefüllt.

3.6. Puffer und Lösungen

Block-Puffer:	3% (w/v) BSA in TBST-Puffer (Strp-HRP, anti-His) 2% (w/v) Milch in TBST-Puffer (anti-MBP, anti-c myc, anti-pIII)
Coomassie-Entfärbelösung:	40% (v/v) Ethanol 10% (v/v) Essigsäure in ddH ₂ O
Coomassie-Färbelösung:	40% (v/v) Ethanol 10% (v/v) Essigsäure 2,5 g/L Coomassie Brilliant Blau R 250 in ddH ₂ O
6x DNA-Probenpuffer:	0,25% (w/v) Bromphenolblau 0,25% (w/v) Xylencyanol 15% (w/v) Ficoll-400 in ddH ₂ O
Fixierer:	157 g/L Na ₂ S ₂ O ₃ · 5 H ₂ O 20 g/L K ₂ S ₂ O ₅ in ddH ₂ O
Gelfiltrationspuffer:	20 mM Phosphatpuffer 50 mM NaCl 1 mM DTT pH 7,5
Hefe-Transformations-Prämix:	240 µL 50% (w/v) PEG 4000 36 µL 1 M Lithiumacetat 20 µL Heringssperma-DNA (2 mg/mL) 30 µL ddH ₂ O

HPLC-Puffer A:	0,05% (v/v) TFA in ddH ₂ O
HPLC-Puffer B:	0,05% (v/v) TFA in Acetonitril
Ni ²⁺ -NTA-Puffer A:	50 mM Tris/HCl 300 mM NaCl pH 8,0
Ni ²⁺ -NTA-Puffer B:	50 mM Tris/HCl 300 mM NaCl 250 mM Imidazol pH 8,0
ONPG-Lösung:	4 mg/mL o-Nitrophenyl-β-D-galaktopyranosid (ONPG) in Z-Puffer pH 7,0
Reagent K:	750 mg (5%) Phenol 500 µL (5%) Thioanisol 250 µL (2,5%) Ethandithiol 500 µL (5%) ddH ₂ O in 10 mL (82,5%) TFA
SDS-Gel-Laufpuffer:	50 mM Tris 250 mM Glycin 0,1% (w/v) SDS
4x SDS-Probenpuffer:	50 mM Tris/HCl 8% (w/v) SDS 40% (v/v) Glycerin 20% (v/v) β-Mercaptoethanol 0,2% (w/v) Bromphenolblau pH 6,8

Transferpuffer für Western-Blots: 3 g Tris

14,4 g Glycin

150 mL techn. Methanol

ad 1 L ddH₂O

Waschpuffer für Western-Blots: 50 mM Tris/HCl

137 mM NaCl

1 mL Tween 20

ad 1 L ddH₂O

pH 7,6

X-Gal-Lösung:

20 mg/mL 5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-
galaktopyranosid (X-Gal)

in DMF

Z-Puffer:

60 mM Na₂HPO₄ · 7 H₂O

40 mM NaH₂PO₄ · H₂O

10 mM KCl

1 mM MgSO₄ · 7 H₂O

pH 7,0

4. Methoden zu Projekt 1

4.1. Molekularbiologische Techniken

Alle im Rahmen der vorliegenden Doktorarbeit angewandten molekularbiologischen Techniken sind in der Literatur erwähnt und wurden gemäß entsprechenden Anwendungsvorschriften durchgeführt [237]. Sie erstreckten sich von der Plasmidpräparation aus *E. coli* durch alkalischen Zellaufschluss [238] über die DNA-Vervielfältigung mittels Polymerasekettenreaktion (PCR) [239], die Punktmutations-PCR nach dem QuickChange SiteDirected Mutagenesis-Protokoll der Firma *Stratagene* [10], die DNA-Gelextraktion und PCR-Produktreinigung mit Hilfe der QIAquick-spin-Säulen der Firma *Qiagen* bis hin zur Ligation von DNA-Fragmenten durch die T4-DNA-Ligase und der Plasmidreinigung unter Anwendung des GeneJet Plasmidpräparations-Systems der Firma *Fermentas*.

4.1.1. Konstruktion der Expressionsplasmide

Nachstehend wird der Entstehungsprozess der einzelnen im Rahmen des Projektes 1 verwendeten Plasmide und den aus ihnen resultierenden Konstrukten erläutert. Bei PCR-Primern sind eingeführte Restriktionsschnittstellen unterstrichen und durch Punktmutation-PCR veränderte Basen fett dargestellt. Sofern „Restriktionsschnittstellen“ aufgrund von doppelsträngigen DNA-Sequenzen aus aneinander angelagerten Oligonukleotiden endständig und nicht vollständig erscheinen, wird die fehlende Basenabfolge jenseits eines vertikalen Striches aufgeführt. Die genutzten Konstrukte und die für die Klonierungen notwendigen Oligonukleotide sind im Anhang in den Tabellen 11 bis 14 aufgelistet.

Konstrukt 1, Abl SH3-His₆ (pDG017): Im Plamid pHM41 [160] wurde zuerst die FKBP-Domäne mittels des *KpnI/BamHI*-Fragmentes aus den beiden Oligonukleotiden 5'-GGTAC|CCTCGAGGCTGGCGCATCTG-3' (oDG013) und 5'-G|GATCCAGATGCGCCAGCCTCGAGGGTAC-3' (oDG014) ersetzt. Im resultierenden Plamid pDG003 wurde MBP-VMA^N durch das PCR-Produkt der Primer 5'-ATACCATGGCCCCAGGCCCTGTTTGTGGCACTCTATGATTTG-3' (oHM108) und 5'-ATAGGATCCGGTACCGGTAGAGTTAACGGGGGTGATGTAGTTGC-3' (oDG004) sowie des Templates pTYB2-Abl SH3 [240] über die Schnittstellen *NcoI* und *KpnI* gegen die natürliche c-Abl SH3-Domäne ausgetauscht. Ab-

schließlich wurde die Sequenz aus Abl SH3-His₆ aus dem erhaltenen Plasmid pDG004 mittels *NcoI* und *HindIII* herausgetrennt und in einen pET16b-Vektor kloniert. Man erhielt das Plasmid pDG017.

Konstrukt 2, Abl SH3 (A4W)-His₆ (pDG022): Mit Hilfe der Primer 5'-CAGGCCCTGTTTGTGTGGCTCTATGATTTTGTGG-3' (oDG007) und 5'-CCACAAAATCATAGAGCCACACAAACAGGGCCTG-3' (oDG008) wird im Templat pDG017 das Kodon des Ala4 gegen Trp ausgetauscht. Aus der Punktmutations-PCR ging das Plasmid pDG022 hervor.

Konstrukt 3, Abl SH3 (A4F)-His₆ (pDG035): Das Plasmid pDG035 ist das Ergebnis einer Punktmutations-PCR mit den Primern 5'-CAGGCCCTGTTTGTGTTCCTCTATGATTTGTGG-3' (oDG023) und 5'-CCACAAAATCATAGAGGAACACAAACAGGGCCTG-3' (oDG024) sowie dem Templat pDG017. Hierbei wurde Ala4 durch Phe ersetzt.

Konstrukt 4, Abl SH3 (A4V)-His₆ (pDG023): Eine Punktmutations-PCR des Templates pDG017 mit den Primern 5'-CAGGCCCTGTTTGTGGTGCTCTATGATTTTGTGG-3' (oDG009) und 5'-CCACAAAATCATAGAGCACACAAACAGGGCCTG-3' (oDG010) lieferte pDG023.

Konstrukt 5, Abl SH3 (A4W/I18A)-His₆ (pDG028): Einer weitere Punktmutations-PCR mit dem Plasmid pDG022 und den Primern 5'-GATAACACTCTCAGCGCCACTAAAGGTGAAAAG-3' (oDG021) sowie 5'-CTTTTCACCTTTAGTGGCGCTGAGAGTGTTATC-3' (oDG022) lieferte die A4W/I18A-Doppelmutante der Abl SH3-Domäne (pDG028).

Konstrukt 6, LexA-Abl SH3 (pDG046): Bevor die Abl SH3-Domäne in den Vektor der DNA-bindenden Domäne LexA pGILDA kloniert werden konnte, musste jener erst angepasst werden. Zuerst wurde durch eine Punktmutations-PCR mit den Primern 5'-GATCCGTCGACCATGGCGGCCGC-3' (oDG035) und 5'-GCGGCCGCGCATGGGTGACGGATC-3' (oDG036) eine neue *NcoI*-Schnittstelle im Plasmid aufgebaut. Danach musste in einer zweiten Punktmutations-PCR mit dem zuvor erhaltenen Plasmid pDG044, um eine überstehende Aminosäure-Sequenz im Hybridprotein zu vermeiden, mit Hilfe der Primer ein Stop-Kodon eingeführt werden (pDG045). Abschließend wurde die Abl SH3-Domäne über ein *NcoI/XhoI*-Fragment aus pDG017 isoliert und in das zuvor erstellte und ebenfalls mit *NcoI* und *XhoI* verdaute pDG045 hineinkloniert, woraufhin pDG046 entstand.

Konstrukt 7/7a, LexA-Abl SH3 (A4F) (pDG063): Durch Verdau von pDG035 mit den Enzymen *NcoI* und *XhoI* erhielt man das Fragment welches in pDG046 die natürliche durch die mutierte SH3-Domäne ersetzte. Um spätere Probleme bei der Einführung der DNA-Bibliothek zu vermeiden, wurde das erhaltene Plasmid pDG047 einer Punktmutations-PCR mit den Primern 5'-CGTGGAGGGTAATTCTGGATGCCTCTGCAAAGCTTTC-3' (oDG062) und 5'-GAAAGCTTTGCAGAGGCATCCAGAATTACCCTCCACG-3' (oDG063) unterzogen, damit eine im *HIS3*-Gen angesiedelte *NheI*-Schnittstelle deletiert wurde. Das Produkt bildete das Plasmid pDG063.

Konstrukt 7a basiert auf einem Austausch der Aminosäure-Sequenz ab Position 11 der SH3-Domäne zuerst durch eine Chloramphenicol-Resistenzkassette (pDG066) und anschließend durch eine der hergestellten DNA-Bibliotheken.

Konstrukt 8, B42 AD-HA Tag-Abl SH3-Erkennungssequenz-His₆ (pDG043): Um das Fragment aus SH3-Erkennungssequenz [220] und His₆ zu erhalten, muss kurz die Entstehung des Plasmids pDG001 beschrieben werden. Das Plasmid pDG001 resultiert aus dem Austausch des Fragmentes FRB-VMA^C aus pHM45 [160] durch das kurze, synthetische DNA-Stück aus den Oligonukleotiden 5'-G|AATTCGCTCCAACCTACTCTCCTCCACCTCCACCTGGTGGTA-3' (oDG001) und 5'-G|GATCTACCACCAGGTGGAGGTGGAGGAGAGTAAGTTGGAGCG-3' (oDG002). Aufgrund des Überhangs am 5'-Ende des 3'-Oligonukleotids wird die vorhandene *Bam*HI-Schnittstelle zerstört. Das PCR-Produkt aus SH3-Erkennungssequenz-His₆ (Primer: 5'-CGATGAAGCCCTGAAAGACG-3' (oSB08) und 5'-GCTACCCTCGAGACCGCGCTACTGCCGCC-3' (oDG039); Templat: pDG001) wurde nun über *Eco*RI und *Xho*I in den pB42AD-Vektor zur Bildung des zweiten Hybridproteins kloniert, wodurch pDG043 erhalten wurde.

4.1.2. Generierung einer DNA-Bibliothek via epPCR oder rekursive PCR

Die DNA-Bibliothek ab Ser11 zur Kompensierung des Raumbedarfes im hydrophoben Kern der A4F-Mutante der Abl SH3-Domäne wurde mit zwei unterschiedlichen Verfahren hergestellt.

Zum einen wurde gemäß der Vorschrift [17] das GeneMorph II-System der Firma *Stratagene* genutzt, um eine epPCR mit einer durchschnittlichen Mutationsrate von ca. 17 pro 1000 bp durchzuführen.

Bei der zweiten Methode, die unter dem Namen rekursive PCR (engl. *recursive PCR*) von Prodromou und Pearl entwickelt worden ist [241], wird das DNA-Fragment künstlich aus miteinander überlappenden Oligonukleotiden aufgebaut. Die Abschnitte zwischen den Überlappstellen können frei gewählt werden. Daher wurden die Kodons der Aminosäuren Leu16, Ile18, Leu24, Val47 und Ile52, die Bestandteile des hydrophoben Kernes sind, gegen die Basensequenz NBS (N = alle 4 Basen, B = C, G, T und S = C, G) ausgetauscht. Dazu wurden die nachfolgend erwähnten Oligonukleotide eingesetzt (überlappende Sequenz in Großbuchstaben, frei wählbare in Kleinbuchstaben, Restriktionsschnittstellen unterstrichen und NBS- bzw. SVN-Sequenz fett hervorgehoben): 5'-ctctatgattttGTGGCTAGCGGAGATAAC-3' (oDG073), 5'-GATTATAACCCAAGACCCG**svn**cttttcaccttagt**svng**ct**svn**agtGTTATCTCCGCTAGCCAC-3' (oDG074), 5'-CGGGTCTTGGGTTATAATCacaatgGGGAATGGGCTGAAGCC-3' (oDG075), 5'-CCATCCTTGGCCATTTTTCgtttgGGCTTCAGCCCATTCCC-3' (oDG076), 5'-GAAAAATGGCCAAGGATGG**nb**sccaagcaactac**nb**sACCCCCGTTAACTCTACC-3' (oDG077) und 5'-gggtactact**cg**agggtaccGGTAGAGTTAACGGGGGT-3' (oDG078). Die beiden flankierenden Primer oDG073 und oDG078 (je 30 pmol) wurden in einem 100-fachen Überschuss zu den „internen“ Oligonukleotiden eingesetzt. Die Temperaturbedingungen während der 30 PCR-Zyklen mit der Phusion-Polymerase von *New England Biolabs* wurden wie folgt gewählt.

Aufschmelzen	30 s	98°C
Anlagern der Oligonukleotide	2 min	56°C
Erweitern des PCR-Produktes	1 min/kb	72°C
Abschluss der PCR	10 min	72°C

4.1.3. Sequenzierung der Plasmide und PCR-Produkte

Alle Plasmide die nicht ausschließlich aus Verdauen von zwei Plasmiden mit Restriktionsenzymen und anschließender Ligation hervorgingen, wurden durch die Firma *GATC Biotech* (Konstanz, Deutschland) sequenziert. Im Falle wichtiger PCR-Produkte wurden auch diese durch Sequenzierung überprüft.

Die Sequenzierung von Plasmiden aus Kolonien, die aus dem Einsatz von DNA-Bibliotheken resultierten, erfolgte grundsätzlich nach der 300 bp-HotShot-Methode, die von der Firma *Seqlab* (Göttingen, Deutschland) durchgeführt wurde.

Die Plasmide für Sequenzierungen wurden in der Regel als über Spin-Säulchen gereinigte DNA in der von den Unternehmen vorgegebenen Konzentration eingesandt. Die Primer für die Sequenzierungsreaktionen wurden entweder von den Unternehmen vorrätig gehalten oder ihnen, zusammen mit den DNA-Proben, postalisch zugestellt.

4.2. Techniken im Zusammenhang mit den Hefe-2-Hybridexperimenten

Viele in den nachfolgenden Kapiteln erwähnten Techniken können vollständig oder mit leichten Abwandlungen im *Yeast Protocols Handbook* der Firma *Clontech* nachgelesen werden [242]. Die Zusammensetzung der verwendeten Lösungen wurde in Kapitel 3.6 erläutert.

4.2.1. Transformation von Hefezellen mit Plasmid-DNA

Die Transformation der Hefezellen mit der Plasmid-DNA erfolgte nach der Lithiumacetat-Methode von Ito *et al.* [243]. Allerdings wurden in dieser Arbeit Abwandlungen der Verbesserungen von Schiestl und Gietz [244, 245] genutzt.

In Kürze beschrieben, wurde eine 10 mL Übernachtskultur (235 Upm, 28°C) von einer Hefekolonie in SD-Medium (ohne entsprechende Aminosäure(n)/2% Glc) am anderen Tag in 30 mL SD-Medium (wie Übernachtsmedium) so verdünnt, dass eine OD₆₀₀ von 0,2 bis 0,3 sich einstellt. Nach 4 bis 4,5 h Schütteln bei 235 Upm und 28°C sollte eine Verdopplung der optischen Dichte erreicht worden sein und die Zellen werden pelletiert (1500 Upm, 5 min, RT). Auf das Abdekantieren des Überstandes folgt eine Waschung der Zellen mit 15 mL sterilem ddH₂O. Durch Zentrifugieren werden die Zellen erneut pelletiert (1500 Upm, 5 min, RT), anschließend in 1 mL ddH₂O resuspendiert und in ein 1,5 mL-Reaktionsgefäß überführt. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt (13000 Upm, 30 s, RT) werden die Zellen in 1 mL ddH₂O aufgenommen und á 100 µL aliquotiert. Eine erneute Zentrifugation der Zellen (13000 Upm, 30 s, RT) erlaubt pro Ansatz einen Austausch des Überstandes gegen 326 µL Transformationsmix und eine Lösung von 200 ng DNA in 34 µL ddH₂O. Die Zellsuspension wird nun 45 min bei 42°C im Wasserbad inkubiert und danach sofort 30 s im Eis abgekühlt. Nach einem Zentrifugationsschritt (13000 Upm, 1 min, RT) wird der Überstand entfernt und die Zellen jeden Ansatzes in 500 µL Wasser resuspendiert. 100 bis 150 µL jener Zellsuspension

wurden auf einer auf Raumtemperatur erwärmten Festmediumplatte (dem Experiment entsprechendes SD-Medium) ausgestrichen und mindestens 3 Tage bei 30°C inkubiert.

4.2.2. Fortführung des Hefe-2-Hybridsystems nach der Transformation

Im Falle einer Durchführung eines Experimentes mit der DNA-Bibliothek, waren nach der Transformation alle für das Hefe-2-Hybridsystem notwendigen Plasmide in der Hefezelle vorhanden. Es zeigte sich jedoch, dass die Hefezellen, die direkt nach der Transformation auf Platten mit Selektionsmedium (SD-Medium ohne His, Trp, Ura und Leu, aber mit 2% Gal sowie 1% Raf) ausgestrichen wurden, nicht überlebten. Deshalb wurden sie zunächst auf SD-Festmedium (-His/-Trp/-Ura/2% Glc) ca. 3 Tage bei 30°C inkubiert. Anschließend wurden die Hefekolonien auf Platten mit Selektionsbedingungen umgestempelt und erneut 3 Tage bei 30°C inkubiert. Die „Kolonien“ von denen angenommen wurde, sie seien auf dem Selektionsmedium angewachsen, wurden zur Kontrolle auf neue Platten mit Selektionsbedingungen umgestrichen. Die nach erneuter Inkubation bei 30°C gewachsenen Kolonien wurden für weitere Analysen genutzt und als Suspension in 1 mL einer 25% (v/v) Glycerollösung bei -80°C konserviert.

4.2.3. Der Kolonie-Lift Filterassay mit X-Gal

Neben dem Leben/Tod-Reportergen *LEU2* besitzt das eingesetzte Hefe-2-Hybridsystem noch die kontrollierte Expression des Gens für die β -Galaktosidase, die bestimmte Substrate zu Farbstoffen oder ihren Vorläufern und Galaktose spalten kann. Ein Substrat, das die Anwesenheit der β -Galaktosidase qualitativ nachweisen kann ist das X-Gal (5-Brom-4-chlor-3-indoxyl- β -D-galaktopyranosid). Es wird dem Enzym, das durch Zerstörung der Zellwand freigesetzt wird, von außen zugeführt.

Eine Methode, die den genannten Prozess absolviert ist der Kolonie-Lift Filterassay [246]. Zuerst wird ein Filterpapier in 5 mL einer Lösung aus 98% (v/v) Z-Puffer, 1,7% (v/v) X-Gal-Lösung und 0,3% (v/v) β -Mercaptoethanol inkubiert. Anschließend wird ein zweites Filterpapier über die Kolonien auf einer Platte mit Selektionsbedingungen gelegt und die anhaftenden Hefezellen durch 3-maliges Einfrieren in flüssigem Stickstoff und anschließendes Auftauen auf Raumtemperatur aufgeschlossen [247]. Mit der Seite der Kolonien nach oben

zeigend wird das zweite auf das erste Filterpapier gelegt und beide bei Raumtemperatur inkubiert. Die Bildung eines blauen Farbstoffes zeigt die erfolgreiche Transkription des *lacZ*-Gens.

4.2.4. Bestimmung der β -Galaktosidase-Aktivität mittels ONPG-Assay

Um quantitative Aussagen über die gebildete Menge an β -Galaktosidase treffen zu können, entwickelte Miller ein Experiment, das den Verbrauch des Substrates ONPG (o-Nitrophenyl- β -D-galaktopyranosid) misst [248]. Das Ergebnis des Verfahrens ist die Definition der Stoffmenge an β -Galaktosidase in Miller-Einheiten, die notwendig ist um pro Minute und Zelle 1 μ mol ONPG in Galaktose und o-Nitrophenol zu hydrolysieren.

Von einer Übernachtskultur (235 Upm, 28°C) in SD-Medium unter Selektionsbedingungen überführt man 2 mL in 8 mL neuen SD-Mediums. Daraufhin werden die Hefezellen bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5 bis 0,8 herangezogen und die optische Dichte bei 600 nm gemessen. Die Kultur wird á 1,5 mL auf drei Reaktionsgefäße verteilt und die Hefezellen (13000 Upm, 30 s) werden pelletiert. Anschließend wird der Überstand gegen 1,5 mL Z-Puffer ausgetauscht. Nach einem erneuten Zentrifugationsvorgang (13000 Upm, 30 s) werden die Zellen in 300 μ L neuem Z-Puffer resuspendiert, was in einer Ankonzentration der Zellen um den Faktor 5 resultiert. 100 μ L der Hefezellen werden in einem neuen Reaktionsgefäß durch 3-maliges Einfrieren in flüssigem Stickstoff und anschließendes Auftauen in einem Wasserbad bei 37°C aufgeschlossen. Zur selben Zeit wird eine Negativ-Kontrolle mit 100 μ L Z-Puffer derselben Prozedur unterzogen. Nun werden jeweils 700 μ L einer Lösung von 270 μ L β -Mercaptoethanol in 100 mL Z-Puffer hinzugegeben. Die Zeitmessung wird gestartet sobald 160 μ L der ONPG-Lösung hinzugefügt werden. Bei 30°C wird auf einen gelben Farbumschlag gewartet und die Reaktion mit 400 μ L 1 M Na₂CO₃-Lösung gestoppt. Nach einem Zentrifugationsvorgang wird die Absorption des Überstandes bei 420 nm bestimmt. Schließlich können gemäß Gl. 1 die Miller-Einheiten berechnet werden.

$$\text{Miller - Einheiten} = \frac{1000 \cdot \text{OD}_{420}}{t \cdot V \cdot \text{OD}_{600}} \quad (\text{Gl. 1})$$

wobei t während der Reaktion abgelaufene Zeit [min]
 V 0,1 mL Zellsuspension multipliziert mit dem Konzentrationsfaktor

4.2.5. Plasmid-Präparation und deren Vereinzelung

Die Präparation von Plasmiden aus Hefezellen kann in weiten Teilen nach demselben Protokoll erfolgen, das für die alkalische Lyse von *E. coli*-Zellen entwickelt wurde [238]. Lediglich für das Aufbrechen der Zellwände sind stringenter Bedingungen notwendig. Deshalb wird nach dem Resuspendieren der Hefezellen in Tris/HCl-Puffer, der EDTA und RNase A enthält, die Suspension mit ca. 80 µL säuregewaschenen Glaskügelchen versetzt und 5 Minuten vortexiert. Nachdem die Glaskügelchen sich abgesetzt haben, wird der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt und entsprechend der normalen Prozedur mit dem alkalischen Lysepuffer, der Natronlauge und SDS enthält, versetzt.

Als Ergebnis der Präparation werden alle in der Hefezelle vorhandenen Plasmide isoliert. Soll nur die DNA von einem Plasmid z. B. für Sequenzierungsreaktionen isoliert werden, ist eine Vereinzelung der Plasmide in *E. coli*-Zellen notwendig. Zu diesem Zweck wurde der KC8-Stamm entwickelt. Er besitzt genau wie der Hefestamm Defekte in der Biosynthese der Aminosäuren His, Trp, Ura und Leu. Da nur die Auxotrophiemarker auf den Plasmiden die Biosynthese der entsprechenden Aminosäure (z. B. *HIS3* für His) ermöglicht, kann durch die Wahl der im M9 Minimal-Festmedium vorhandenen Aminosäuren die Anwesenheit des gewünschten Plasmids in der Zelle erzwungen werden. Es zeigte sich, dass bereits die Inkubation der transformierten *E. coli*-Zellen bei 37°C über Nacht ausreicht, damit nur noch das gewünschte Plasmid in den Zellen vorliegt. Um ein Hintergrundwachstum von Bakterienzellen weiter zu verringern, können die Festmedium-Platten zusätzlich 50 µg/mL Ampicillin enthalten, da alle Plasmide eine Ampicillinresistenzkassette aufweisen.

4.3. Protein-Techniken

Die Analytik der exprimierten und aufgereinigten Proteine wurde gemäß Standardvorschriften absolviert [237]. Sie umfasste die Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE) mit Natriumdodecylsulfat (SDS) [249], die Coomassie-Brilliant Blue R250 Färbung der SDS-Polyacrylamidgele [250], die Western-Blot-Analyse [251] sowie die photometrische Bestimmung der Proteinkonzentration bei 280 nm [252]. Bezüglich der verwendeten Puffer und Lösungen sei auf das Kapitel 3.6 verwiesen.

4.3.1. Genexpression in *E. coli*

Alle in Tabelle 11 erwähnten Konstrukte wurden aus Bakterienkulturen in 300 bzw. 600 mL LB-Medium erhalten. Dazu wurde das beabsichtigte Volumen LB-Medium 100:1 mit einer Übernachtskultur von *E. coli*-Zellen des Stammes BL21 (DE3) oder BL21 Gold (DE3) angeimpft. Entsprechend dem verwendeten Plasmid war das Medium vor Verwendung mit dem Antibiotikum versetzt worden (Ampicillin: 100 µg/mL, Kanamycin: 50 µg/mL und Chloramphenicol: 34 µg/mL). Enthielt das Zielprotein ein MBP und war eine Aufreinigung über eine Amylose-Säule beabsichtigt, wurde die Bildung der endogenen Amylase durch Zugabe von 0,2% Glukose ins Medium unterdrückt. Sobald eine OD₆₀₀ von 0,4 erreicht worden war, wurde die Temperatur von 37°C auf 25 bis 30°C je nach Protein verringert. Die Geschwindigkeit des Schüttelprozesses wurde während der gesamten Expression konstant auf 250 Upm gehalten. Mit Erreichen einer OD₆₀₀ von 0,5 bis 0,7 wurde die Bildung des gewünschten Proteins durch Zugabe von IPTG (Isopropyl-β-D-thiogalaktosid) in einer Endkonzentration von 0,4 mM induziert. Nach 3 bis 5 h Inkubation bei 25 bis 30°C wurden die Zellen bei 4°C pelletiert (7000 Upm, 15 min). Daraufhin wurde das überstehende Medium abdekantiert und die Zellen in ca. 15 mL eines Puffers, der für die beabsichtigte Aufreinigung adäquat war, resuspendiert. Die Zellsuspension konnte nun bei -20°C gelagert werden.

4.3.2. Zellaufschluss

Bevor die Zellen mit dem Emulsifier (Emulsiflex-C5) der Firma *Avestin* durch einen Druckunterschied von ca. 7 Mpa aufgeschlossen wurden, mussten sie vollständig resuspendiert werden. Zur Vervollständigung des Zellaufschlusses wurde die Prozedur mindestens zweimal durchgeführt. Einige Proben mussten dem Druckunterschied auch dreimal ausgesetzt werden. Der nachfolgende Zentrifugationsschritt bei 4°C (17000 Upm, 30 min) trennte die löslichen Bestandteile der Bakterienzellen von den unlöslichen Zelltrümmern. Abschließend wurde der Überstand mit den gelösten Proteinen vom Zellpellet getrennt und einer Proteinaufreinigung unter nativen Bedingungen zugeführt.

4.3.3. Chromatographische Proteinaufreinigung

4.3.3.1. Affinitätschromatographie an immobilisierten Ni^{2+} -Ionen

Alle im Rahmen dieser Arbeit benutzten Konstrukte (siehe Tabelle 11) besaßen einen N- oder C-terminalen Affinitäts-Tag, der zur Aufreinigung mittels Affinitätschromatographie genutzt wurde. Häufig bestand der Tag aus einer Hexahistidin-Sequenz, die in der Ni^{2+} -NTA-Chromatographie genutzt wird. Die Grundlagen der Chromatographie mit immobilisierten Ni^{2+} -Ionen ist ausführlich in der Diplomarbeit [253] beschrieben. Prozeduren mit anderen Affinitäts-Tags sind in dem Kapitel 9.2.1 erwähnt.

Die Säule, die entweder mit der „Superflow“-Matrix der Firma *Qiagen* oder dem „Ni-Sepharose 6 fast flow“-Material der Firma *GE Healthcare* befüllt worden war, wurde zunächst mit einem Gemisch aus 3% Puffer B und 97% Puffer A (\rightarrow 7,5 mM Imidazol) äquilibriert. Das Volumen des Säulenmaterials bestand meist aus 1 mL konnte aber auch je nach dem Volumen der Expressionskultur geringer ausfallen. Zeitgleich mit der Äquilibration der Säule durch das „Äkta prime plus“-System, einer FPLC-Anlage (engl. *fast-performance liquid chromatography*) der Firma *GE Healthcare*, wurde der die löslichen Proteine enthaltende Überstand mit einer 5 M Imidazol-Lösung auf die Anfangskonzentration von 7,5 mM eingestellt. Anschließend wurde die lösliche Proteinfraction mit einer maximalen Fließgeschwindigkeit von 0,5 mL/min zweimal nacheinander aufgetragen. Zur Ablösung unspezifisch bindender Proteine wurde die Säule nachfolgend solange mit 7% Puffer B (\rightarrow 17,5 mM Imidazol) gewaschen bis das Signal des UV-Detektors die Nullmarke erreicht hatte. Die an der Säulenmatrix verbliebenen Proteine wurden durch einen linearen Gradienten von 7 auf 60% und danach von 60 auf 100% Puffer B innerhalb von 20 bzw. 10 min eluiert. Durch Verbleiben bei 100% Puffer B wurde die Säule gespült, um nach dem Herunterfahren der Imidazol-Konzentration auf den Anfangswert von 7,5 mM oder 3% Puffer B erneut für eine Proteinaufreinigung zur Verfügung zu stehen. Bei allen Elutionsschritten wurde die Flussrate auf 1 mL/min erhöht. In der Regel konnte das Säulenmaterial für 2 bis 3 Durchgänge genutzt werden, bevor es regeneriert werden musste. Die erhaltenen Eluat-Fractionen wurden per SDS-PAGE analysiert und ausreichend reine und in der Proteinkonzentration hohe Proben wurden vereinigt. In drei Schritten wurden die Proteine für Projekt 1 gegen den Gelfiltrationspuffer dialysiert.

4.3.3.2. Erhöhung der Proteinreinheit durch Gelfiltrations-Chromatographie

Da Aufreinigungen mit der Ni^{2+} -NTA-Chromatographie nur Proteinreinheiten von ca. 80% ermöglichen, musste z. B. für die in Kapitel 4.5.4 beschriebene Bestimmung der Dissoziationskonstanten der Reinheitsgrad mit Gelfiltrations-Chromatographie gesteigert werden. Bei diesem Verfahren werden die Proteine, aufgrund der Möglichkeit unterschiedlich stark in die Hohlräume des Säulenmaterials zu diffundieren, anhand ihrer Größe und globulären Struktur getrennt. Da für große und/oder viel Raum ausfüllenden Proteine weniger Poren zugänglich sind, eluieren diese zuerst. Den Abschluss bilden die im Puffer gelösten Salze.

Zuerst wurde der Gelfiltrationspuffer im Vakuum einer Membranpumpe entgast und anschließend für 1 h ein Stickstoffstrom hindurchgeleitet. Der so präparierte Puffer wurde genutzt, um die „HiLoad 16/60 Superdex 75“-Säule der Firma *GE Healthcare*, die an eine „Äkta prime plus“-Anlage angeschlossen war, über Nacht mit zwei Säulenvolumina bei einer Flussrate von 0,2 mL/min zu äquilibrieren. Nachdem die Protein-Probe durch einen Zentrifugationsvorgang (13000 Upm, 10 min, 4°C) von unlöslichen Bestandteilen befreit worden war, wurde das Zentrifugat mit einer Fließgeschwindigkeit von 0,7 mL/min aufgetragen. Die einzelnen Proteine der Probe eluierten zeitversetzt in unterschiedliche Fraktionen, die per SDS-PAGE untersucht wurden. Fraktionen, die das gewünschte Protein enthielten wurden vereinigt und in einem Dialyseschritt mit 10% (v/v) Glycerol versetzt. Nach der abschließenden, photometrischen Bestimmung der Proteinkonzentration mittels des theoretischen Extinktionskoeffizienten bei 280 nm (siehe Tabelle 11) wurden die Proteine aliquotiert und bei -80°C gelagert.

4.3.4. Die Western-Blot-Analytik

Da die Analytik mittels Western-Blot in beiden Projekten dieser Doktorarbeit von entscheidender Bedeutung ist, soll das Verfahren kurz erläutert werden. Entscheidend beim Western-Blot ist die spezifische Erkennung geringster Konzentrationen einer Epitop-Sequenz eines Antigens durch einen Antikörper. Weiterhin wird die Größen-Auftrennung der vorhergehenden SDS-PAGE ausgenutzt, um die detektierten Proteine zu identifizieren.

Die während einer SDS-PAGE anhand ihrer elektrophoretischen Mobilität getrennten Proteine und evtl. Peptide wurden in einem Elektro-Nassblot-Verfahren mit Hilfe des Transferpuffers auf eine PVDF-Membran übertragen und dort immobilisiert. Anschließend wurde die

noch nicht belegte Membran-Oberfläche in Abhängigkeit der nachfolgend zum Einsatz kommenden Antikörper bzw. HRP-Konjugate (engl. *horseradish peroxidase*, Meerrettich Peroxidase) mit 3% (w/v) BSA (PentaHis-Antikörper und Streptavidin/HRP-Konjugat) oder 2% (w/v) Milchpulver (anti-c myc-, anti-MBP- und anti-pIII-Antikörper) gelöst im Waschpuffer für 1 h bei Raumtemperatur geblockt. Nun wurde die Membran mit dem ersten Antikörper in dem entsprechenden Blockpuffer gelöst für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Um unspezifisch bindende Antikörper oder Streptavidin/HRP-Konjugat zu minimieren, wird die Membran 5-mal für ca. 6 min mit ca. 30 mL Waschpuffer gereinigt. Im Falle des Streptavidin/HRP-Konjugats konnte anschließend die Detektion erfolgen. In allen anderen Fällen musste der erste Antikörper mit dem anti-Maus/HRP-Konjugat noch detektiert werden. Dazu wurde die Membran mit einer verdünnten Lösung des anti-Maus/HRP-Konjugats in Blockpuffer mit 2% Milchpulver (1:4000) für 1 h inkubiert. Danach wurde der bereits beschriebene Waschprozess wiederholt. Die Detektion der Proteine bzw. Peptide erfolgte durch Umsetzung des luminolhaltigen Substrates des „ECL Western Blot Detection kit“ der Firma *GE Healthcare* mittels der Meerrettich-Peroxidase (HRP). Hierbei entstand eine Chemilumineszenz die einen Röntgenfilm nach Entwicklung und Fixierung schwarz färbte. In Abhängigkeit der eingesetzten Protein- bzw. Peptidkonzentration sowie der Konzentration und Qualität des Erst-Antikörpers oder Streptavidin/HRP-Konjugats konnte die Belichtungszeit von 30 s bis zur maximal möglichen Zeitspanne von ca. 2 h betragen.

4.4. Peptidchemie

Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit eingesetzten Peptide wurden entweder vollständig oder zum überwiegenden Teil automatisch nach der von Merrifield entwickelten Methode der Festphasen-Peptidsynthese hergestellt [254, 255]. Hierbei wird eine Aminosäuresequenz vom C- zum N-Terminus aufgebaut, wobei der C-Terminus der „ersten“ Aminosäure kontinuierlich an eine polymere Matrix gebunden bleibt. Um die Reaktion des N-Terminus der Peptidkette mit einer neu hinzugegebenen Aminosäure regioselektiv ablaufen zu lassen, muss die Aminofunktionalität des neuen Bausteins durch eine Schutzgruppe während der Reaktion abgeschirmt werden. Als Schutzgruppe kam bei allen verwendeten Peptiden die Fmoc-Funktion (9-Fluorenylmethoxycarbonyl-Rest, [256]) zum Einsatz, die sich unter basischen Bedingungen abspalten lässt. Deshalb mussten die für die Seitenkettenfunktionalitäten verwendeten Schutzgruppen orthogonal also säurelabil sein. Weitere Informationen insbesondere im Bezug

auf die Reaktionen der nachfolgend erwähnten Kupplungsreagenzien können der Diplomarbeit [253] entnommen werden.

4.4.1. Allgemeine Arbeitsvorschrift für die automatisierte Peptidsynthese

Alle Ansätze waren auf 0,1 mmol dimensioniert. Für Pep1 wurde als Trägermaterial ein 2-Chlorotriethylchlorid-Harz verwendet. Hieran wurde in einem Standardverfahren mit Hilfe des „Apex 396“ der Firma *Advanced ChemTech* das Peptid vom C- zum N-Terminus aufgebaut. Schwierig zu kuppelnde Aminosäuren in der Sequenz des Pep1 (Ac-Ala1, Ser5 und Pro6-9) wurden zweimal dem Harz zugeführt. In der Regel wurde folgendes Verfahren angewandt: Nachdem das Harz 30 min in trockenem DCM quellen durfte, wurde es mit 2 Äquivalenten (eq.) der ersten Aminosäure und 8 eq. der Base DIPEA (N,N-Diisopropylethylamin) für 2 h inkubiert. Danach wurde das Harz 3-mal mit trockenem DCM gewaschen und daraufhin un-reagierte Stellen am Harz mit Methanol abgesättigt. Daraufhin erfolgte durch 2-malige Inkubation des Harzes in 40%-iger Piperidinlösung in DMF für jeweils 10 min zum ersten Mal eine Entschützungsreaktion. Auf dreimaliges Waschen mit DMF folgte die Initiierung der Kupplungsreaktion durch Zugabe von 5 eq. des zweiten Aminosäurebausteins, 4,8 eq. HBTU und 6 eq. DIPEA. Die Kupplungsdauer betrug im Standardfall 1 h und bei Doppelkupplungsschritten 1 h + 30 min. Die Kupplungsreaktion schloss ein dreimaliger Waschvorgang mit DMF ab, so dass nun eine neue Fmoc-Entschützung möglich war.

4.4.2. Abspaltung vom Harz und Entschützung der Seitenketten

Die Abspaltung der Peptidkette vom Harz und die gleichzeitige Entschützung der Seitenketten fand unter stark sauren Bedingungen mit dem „Reagenz K“ statt. Dieses Gemisch bestand aus 82,5% (v/v) TFA, 5% (w/v) Phenol, 5% (v/v) ddH₂O, 5% (v/v) Thioanisol und 2,5% (v/v) Ethandithiol. Das Harz wurde in dem Abspalt-Mix 3 h bei Raumtemperatur inkubiert. In dieser Zeit fingen die *Scavenger*-Substanzen Thioanisol, Phenol und Ethandithiol die entstehenden Spaltungsprodukte ab und verhinderten so eine erneute Schützung der Funktionalitäten des synthetisierten Peptids. Das freigesetzte Peptid wurde nach den 3 h in 50 mL eiskalten Diethylether quantitativ gefällt. Nach der Zentrifugation (4000 Upm, 10 min, 4°C) wurde der

überstehende Diethylether abdekantiert und das Rohpellet bei -20°C aufbewahrt. Die weitere Reinigung erfolgte mittels präparativer HPLC.

4.4.3. Peptidreinigung mittels präparativer HPLC

Eine Spatelspitze des Rohpellets wurde in ca. 1 mL ddH₂O mit möglichst geringer Zugabe an Acetonitril weitestgehend gelöst und die Lösung von den unlöslichen Bestandteilen durch Zentrifugation (13000Upm, 10 min) getrennt. Die Lösung wurde auf eine Microsorb 300-5 C18 Säule der Firma *Varian* aufgetragen, die einen Bestandteil der präparativen HPLC-Anlage der Prostar-Serie desselben Herstellers bildete. Als mobile Phase kam ein durch einen Gradienten bestimmtes Gemisch von HPLC-Puffer A und B zum Einsatz. Hierbei bestand HPLC-Puffer A aus im Ultraschallbad entgastem ddH₂O mit 0,05% (v/v) TFA und HPLC-Puffer B war eine Lösung von 0,05% (v/v) TFA in Acetonitril. Die Elution erfolgte mittels eines Gradienten der innerhalb von 40 min von 5 auf 100% Puffer B anstieg, wobei die Puffer mit einer Geschwindigkeit von 10 mL/min durch die Säule gepumpt wurden. Nach weiteren 5 min bei 100% Puffer B wurde der Anteil innerhalb von 5 min auf 5% zurückgefahren. Die erhaltenen Eluatfraktionen wurden mit MALDI-TOF-MS analysiert und Fraktionen die das gewünschte Peptid in großer Reinheit enthielten miteinander vereinigt. Nach der Gefrier-trocknung der Eluate wurde das Peptid bei -20°C gelagert. Außerdem wurde die Reinheit der Peptide mittels analytischer HPLC mit der 1100-Serie von *Agilent* und der Eclipse XDB-C18- bzw. der Zorbax 300SB-C3-Säule bestimmt. Die erhaltenen Spektren sind im Anhang in Abbildung 107 dargestellt.

4.4.4. Photometrische Bestimmung der Peptidkonzentration

Besonders in den Fällen, wo nur sehr wenige oder gar keine aromatischen Aminosäuren im zu untersuchenden Peptid vorliegen, hat sich die von Warburg und Christian entwickelte Formel zur photometrischen Konzentrationsbestimmung bewährt [257].

$$c_{\text{Peptid}} = 1,55 \cdot A_{280} - 0,76 \cdot A_{260} \quad (\text{Gl. 2})$$

4.5. Analytische Methoden

4.5.1. Analytische Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC)

Die analytische HPLC wurde ausschließlich genutzt, um die Reinheit der synthetischen Peptide nach der präparativen HPLC und Gefriertrocknung zu bestimmen. Hierfür stand eine Anlage der 1100-Serie der Firma *Agilent* zur Verfügung. Die stationäre Phase bildete eine Eclipse XDB-C18- bzw. eine Zorbax 300SB-C3-Säule. Als mobile Phase wurde das bereits erwähnte Gemisch aus den HPLC Puffern A und B (siehe Kapitel 4.4.3) verwendet.

Nach Auftragung von 10 µL Probenvolumen auf die genutzte Säule wurde der folgende Gradient gefahren. Auf 3 min ausschließlich HPLC Puffer A folgt ein Anstieg auf 60% HPLC Puffer B innerhalb von 22 min. In 3 min werden die noch verbleibenden 40% absolviert. Daraufhin wird die Säule 5 min mit 100% HPLC Puffer B gespült, um schließlich innerhalb von weiteren 5 min auf 0% abzusinken. Dieses Niveau wird noch 3 min gehalten, bevor ein neuer Durchgang starten kann.

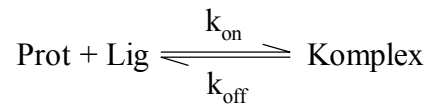
4.5.2. MALDI-TOF-Massenspektrometrie

Die meist zuvor von einer HPLC aufgetrennten Proben wurden hinsichtlich ihrer Masse weiter analysiert. Hierzu wurde das Autoflex II der Firma *Bruker Daltonics* genutzt. Bevor die Massen der Proben nach dem TOF-Verfahren (engl. *time of flight*) über die Messung der Flugzeit im Hochvakuum bestimmt werden können, müssen sie mittels der schonenden MALDI-Methode (engl. *Matrix assisted LASER Desorption/Ionization*) ionisiert werden. Die Matrix bestand aus einer gesättigten Lösung von Dihydroxybenzoesäure (DHB) 50% (v/v) Acetonitril, 50% (v/v) ddH₂O und (v/v) 0,1% TFA. Die Kalibrierung der erhaltenen Spektren erfolgte für Peptide und Protein-Fragmente mit dem „Peptide Standard I“ der Firma *Bruker Daltonics*. Die Massenspektren zu den HPLC-Chromatogrammen der synthetisierten Peptide sind im Anhang in Abbildung 107 gezeigt.

4.5.3. Theoretischer Hintergrund zur Bestimmung der Dissoziationskonstanten

die Abnahme der Fluoreszenzemissions-Intensität der Aminosäure Tryptophan während der Bindung eines Liganden an ein Protein kann genutzt werden, um die Dissoziationskonstante zu bestimmen. Hierzu muss die Veränderung der Fluoreszenz-Intensität an der Stelle des Maximums der ausschließlich Protein enthaltenden Probe beobachtet werden. Da die Bindung des Liganden zu einer Veränderung der chemischen Umgebung des Trp beiträgt, kommt es zu einer Blauverschiebung des Maximums des Emissions-Spektrums. Aufgrund der kontinuierlichen Hinzugabe des Liganden zum Protein, wird die Methode auch als Fluoreszenztitration bezeichnet.

Gemäß dem Massenwirkungsgesetz gilt für die Anlagerungsreaktion des Liganden Gl. 3:



$$K_d = \frac{k_{\text{off}}}{k_{\text{on}}} = \frac{[\text{Prot}] \cdot [\text{Lig}]}{[\text{Komplex}]} \quad (\text{Gl. 3})$$

Hierbei steht K_d für die Dissoziationskonstante in M, k_{on} ist die Geschwindigkeitskonstante der Assoziationsreaktion in $\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$, k_{off} ist die Geschwindigkeitskonstante der Dissoziationsreaktion in s^{-1} , $[\text{Prot}]$ symbolisiert die Konzentration an freiem Protein, $[\text{Lig}]$ diejenige an freiem Liganden und die Konzentration an gebildetem Komplex stellt $[\text{Komplex}]$ dar. Aus der Massenerhaltung kann Gl. 4 abgeleitet werden:

$$[\text{Prot}]_0 = [\text{Prot}] + [\text{Komplex}] \quad \text{und} \quad [\text{Lig}]_0 = [\text{Lig}] + [\text{Komplex}] \quad (\text{Gl. 4})$$

$[\text{Prot}]_0$ und $[\text{Lig}]_0$ bezeichnen die Konzentration an eingesetztem Protein bzw. zugefügtem Liganden. Die Zusammenhänge aus Gl. 4 in Gl. 3 eingesetzt ergibt Gl. 5:

$$K_d = \frac{([\text{Prot}]_0 - [\text{Komplex}]) \cdot ([\text{Lig}]_0 - [\text{Komplex}])}{[\text{Komplex}]} \quad (\text{Gl. 5})$$

Dies ergibt eine quadratische Gleichung die nach der Konzentration des Komplexes aufgelöst werden kann, wobei nur der Wurzelterm mit dem negativen Vorzeichen eine physikalisch sinnvolle Lösung darstellt.

$$[\text{Komplex}] = \frac{[\text{Prot}]_0 + [\text{Lig}]_0 + K_d}{2} - \sqrt{\left(\frac{[\text{Prot}]_0 + [\text{Lig}]_0 + K_d}{2}\right)^2 - [\text{Prot}]_0 \cdot [\text{Lig}]_0} \quad (\text{Gl. 6})$$

Für die gemessene Intensität der Fluoreszenzemission des jeweiligen Protein/Ligand-Komplexes gilt Gl. 7:

$$F = F_0 + F_{\max} \cdot \frac{[\text{Komplex}]}{[\text{Prot}]_0} \quad (\text{Gl. 7})$$

Die gemessene Intensität der Fluoreszenzemission wird F genannt, F_0 steht für die Fluoreszenz vor Zugabe des Liganden und F_{\max} bezeichnet die Intensität der Fluoreszenz, die gemessen wird sobald das Maximum des Spektrums keine weitere Blauverschiebung erfährt. Bei Auftragung der negativen Änderung der Fluoreszenzintensität ($-\Delta F$) gegen die Ligandenkonzentration verwandelt sich Gl. 7 in Gl. 8.

$$-\Delta F = F_0 - F = -F_{\max} \cdot \frac{[\text{Komplex}]}{[\text{Prot}]_0} \quad (\text{Gl. 8})$$

Durch Einsetzen von Gl. 6 in Gl. 8 entsteht schließlich die finale Formel Gl. 9 mit der durch die Messergebnisse ein nicht-linearer quadratischer Fit gelegt werden kann. Die Dissoziationskonstante wird als Variable des Fits berechnet und ausgegeben.

$$-\Delta F = -\frac{F_{\max}}{[\text{Prot}]_0} \cdot \left(\frac{[\text{Prot}]_0 + [\text{Lig}]_0 + K_d}{2} - \sqrt{\left(\frac{[\text{Prot}]_0 + [\text{Lig}]_0 + K_d}{2}\right)^2 - [\text{Prot}]_0 \cdot [\text{Lig}]_0} \right) \quad (\text{Gl. 9})$$

Schließlich wurde noch die gemessene Fluoreszenzintensität mit der Verdünnung, die die Proteinkonzentration durch die Zugabe des Liganden erleidet, verrechnet.

4.5.4. Experimentelle Durchführung der Fluoreszenztitration

Zur Bestimmung des K_d -Wertes über die Veränderung des Fluoreszenzemissionsspektrums der Aminosäure Tryptophan in der Ligandbindestelle wurde das Spektro-Fluorometer FP-6500 der Firma *Jasco* verwendet. Neben einem Motor für das Rührstäbchen, das sich in der Rundküvette befand, besaß das Gerät auch den Temperaturregler ETC-273T, um eine konstante Temperatur des Messaufbaus zu gewährleisten. Alle Messungen erfolgten bei 25,0°C.

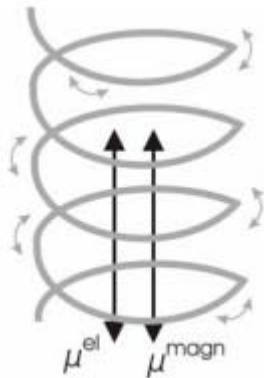
1 mL einer 0,5 oder 1 μ M Lösung des Zielproteins in steril-filtrierte Gelfiltrationspuffer (20 mM Phosphatpuffer (pH = 7,5), 50 mM NaCl und ca. 2 mM DTT) wurde in der Rundküvette vorgelegt. Die Lösung wurde 10 min bei ca. 730 Upm gerührt, damit sie die Temperatur der Messzelle annahm. Danach wurde für 1 min der Rührmotor abgeschaltet und die Messung anschließend begonnen. Die Anregung der Fluoreszenz des Trp erfolgte mit Licht der Wellenlänge 298 ± 5 nm und das Emissionsspektrum wurde mit einer Schrittweite von 0,5 nm und einer Scan-Geschwindigkeit von 200 nm/min im Bereich zwischen 320 und 360 nm aufgenommen. Daraufhin wurden die ersten 2 μ L einer Verdünnung des Liganden im bereits für das Protein verwendeten Puffer hinzugegeben. Auf 1 min Rühren bei ca. 730 Upm folgte 1 min Stillstand der Lösung, bevor das nächste Spektrum aufgenommen wurde. Diese Prozedur wurde so lange durchgeführt bis das Maximum des Emissionsspektrums über fünf Messungen hinweg keine weitere Verschiebung zu niedrigeren Wellenlängen erfuhr. Eine Auftragung der gemessenen Fluoreszenzdifferenz bei der Wellenlänge des Maximums vor Zugabe des Liganden gegen die zugeführte Gesamtligandenkonzentration ermöglichte aufgrund von Gl. 9 (siehe vorhergehendes Kapitel) einen Graphen durch die Messpunkte zu legen.

4.5.5. Theorie der Circular dichroismus-Spektroskopie

Die Messgröße der CD-Spektroskopie ist der Extinktionskoeffizienten-Unterschied ($\Delta\epsilon$) von links und rechts zirkular polarisiertem Licht. Sofern ein Molekül die beiden Lichtsorten unterschiedlich stark absorbiert, wird es als optisch aktiv bezeichnet. In diesem Moment stehen das elektrische und das magnetische Übergangsdipolmoment des zu untersuchenden Moleküls nicht genau senkrecht aufeinander [258]. In symmetrischen Molekülen induziert die einstrahlende elektromagnetische Welle einen Stromfluss, der parallel zum elektrischen Dipolmoment liegt, womit das magnetische Dipolmoment senkrecht dazu stehen muss. In asymmetrischen

Molekülen hingegen verläuft der Stromfluss nicht in einer Ebene sondern folgt einem helikalen Charakter. Das elektrische Dipolmoment weist dadurch auch eine Komponente in Richtung der Helixachse auf. Weshalb das induzierte magnetische Dipolmoment nun teilweise parallel zum elektrischen Dipolmoment verläuft (Abbildung 38).

a)



b)

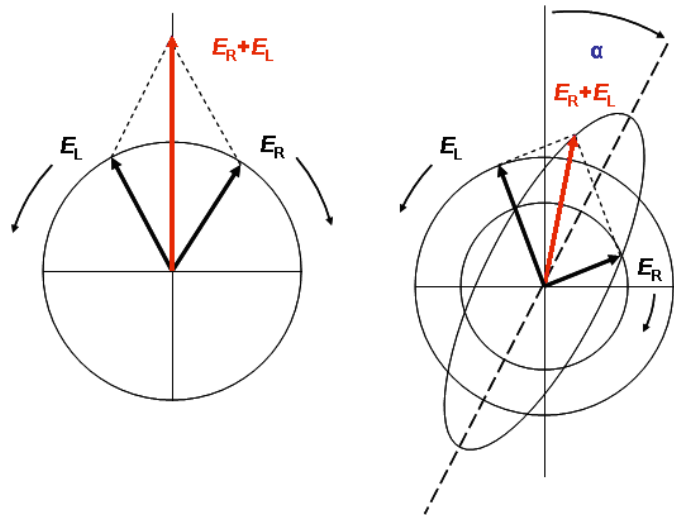


Abbildung 38. Die Auswirkungen von unterschiedlich stark zirkular polarisiertem Licht. a) Kolinearität des elektrischen (μ^{el}) und des magnetischen (μ^{magn}) Dipolmoments. Durch Einstrahlung elektromagnetischer Wellen entsteht ein oszillierender elektrischer Dipol entlang der Helix. Senkrecht zum helikalen Stromfluss wird ein magnetisches Dipolmoment, parallel zum elektrischen Dipolmoment, induziert. b) Sofern E_L und E_R gleich groß sind, erstreckt sich das elektrische Feld in der Papierebene. Sollte das elektrische Feld einer Lichtkomponente sich von der anderen unterscheiden, kippt das resultierende Feld um den Winkel α aus der Papierebene und erhält eine elliptische Form. (nach [259])

Da Proteine eine in hohem Maße asymmetrische Sekundärstruktur besitzen, ist die CD-Spektroskopie ein beliebtes Werkzeug zur Bestimmung des Anteils der drei bekannten Strukturelemente (α -Helix, β -Faltblatt und Zufallsknäuel) an der Proteingestamtstruktur. Für Untersuchungen in diesem Zusammenhang nutzt man Licht im fernen UV-Bereich (180 bis 250 nm) um Schwingungen der Carbonyl-Funktion der Amidbindungen anzuregen. Da die Spektren der einzelnen Strukturelemente, wie auch Abbildung 39 zeigt, unterschiedlich ausfallen und die gemessene Größe der Elliptizität (θ) eine Linearkombination der Elliptizitäten der einzelnen Strukturelemente darstellt, kann der Anteil an der Gesamtstruktur leicht bestimmt werden.

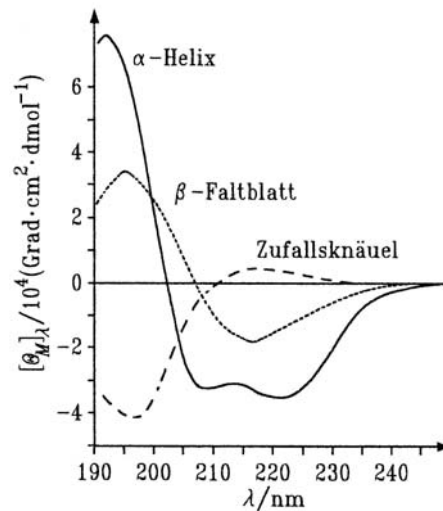


Abbildung 39. Die Fasman Standard-Spektren. Poly-L-Lysin Spektren bei unterschiedlichen Temperaturen, so dass das Peptid entweder als reine α -Helix, reine β -Faltblattstruktur oder als Zufallsknäuel vorliegt. (nach [260])

Hingegen werden Spektren die mit Licht im nahen UV-Bereich (250 bis 350 nm) von der Absorption der aromatischen Aminosäuren bestimmt und fallen für jedes Protein individuell unterschiedlich aus.

Der Zusammenhang zwischen der gemessenen Größe $\Delta\epsilon$ und der in den Spektren angegebenen Elliptizität θ kann nach Gl. 10 berechnet werden:

$$\theta_{\lambda} = \ln 10 \cdot \frac{180^{\circ}}{4\pi} \cdot \Delta\epsilon \cdot c \cdot d \quad (\text{Gl. 10})$$

mit c der Konzentration des Analyten und d der Dicke der verwendeten Küvette. In dieser Arbeit wurde die gemessene Elliptizität θ_{λ} in die in der Literatur übliche mittlere molare Elliptizität pro Aminosäure ($[\theta]_{\text{MRW}}$; engl. *mean residue weight*) umgerechnet. Den Zusammenhang zwischen θ_{λ} und $[\theta]_{\text{MRW}}$ erläutert Gl. 11:

$$[\theta]_{\text{MRW}} = \frac{\theta_{\lambda} \cdot 100 \cdot M_r}{c \cdot d \cdot n} \quad (\text{Gl. 11})$$

Hierbei ist M_r die molekulare Masse des Proteins in g/mol, c die Konzentration in g/L, d die Schichtdicke in dm und n die Anzahl der Aminosäuren. Diese Umrechnung ermöglicht es unterschiedliche Proteine bezüglich ihrer Sekundärstruktur miteinander zu vergleichen.

4.5.6. Bestimmung der Sekundärstruktur mittels Circular dichroismus-Spektroskopie

Zur Bestimmung der Sekundärstruktur der natürlichen SH3-Domäne und ihrer Mutanten wurde das CD-Spektrometer J-810 der Firma *Jasco* genutzt. In die Quarzglas-Küvette der Schichtdicke 1 mm wurde eine 10 μM Lösung des gewünschten Proteins in steril-filtrierte Gelfiltrationspuffer eingefüllt. Die Bestrahlung der Probe erfolgte mit Licht des Wellenlängenbereiches 195 bis 350 nm. Die Schrittweite der Messung betrug 0,1 nm und die Geschwindigkeit 50 nm/min. Die Messergebnisse von jeweils 5 Läufen wurden gemittelt und das Spektrum des Puffers subtrahiert. Die Abweichung der im Spektrum aufgetragenen Wellenlänge von der tatsächlich eingestrahlten durfte maximal 1 nm betragen. Abschließend wurde die experimentell bestimmte Elliptizität gemäß Gl. 11 in die mittlere molare Elliptizität pro Aminosäure umgerechnet.

4.5.7. Thermisch-induzierte Proteinfaltung

Neben denaturierenden Reagenzien ist vor allem zugeführte Wärme in der Regel nachteilig für die Faltung von Proteinen. Durch Veränderung der CD-Spektren eines Proteins, das zunehmend erwärmt wird, kann der Schmelzpunkt bestimmt werden.

Die Messungen wurden mit dem CD-Spektrometer J-810 der Firma *Jasco* absolviert, das über ein Pelletier-Element die Temperatur der Messzelle gezielt steuern konnte. Für die Untersuchung wurde eine Lösung der Konzentration 10 μM des Proteins in der 1 mm dicken Küvette vorgelegt und diese mit zwei Stopfen fest verschlossen. Die Lösung wurde im Bereich von 20 bis 95°C erhitzt und die Veränderung des Messsignals bei 229 nm registriert. Zum Zweck der Dokumentation der Veränderung des CD-Spektrums wurde zusätzlich in 5°C-Schritten der Bereich von 205 bis 240 nm untersucht. Hierbei galten dieselben in Kapitel 4.5.6 beschriebenen Messparameter. Nach Abschluss der Messreihe berechnete das Analyseprogramm „Spectra Analysis“ der Firma *Jasco* neben der Schmelztemperatur auch die physikochemischen Parameter Enthalpie und Entropie der Denaturierungsreaktion.

5. Ergebnisse zur Entwicklung einer schaltbaren c-Abl SH3-Domäne (Projekt 1)

Die Schaltbarkeit der c-Abl SH3-Domäne sollte durch die Bindung eines organischen Moleküls in einer neu geschaffenen Kavität bewirkt werden, wobei die Ligandbindung einen stabilisierenden Effekt auf die Gesamtstruktur des Proteins ausüben sollte. Zur Bildung der Kavität sollte im ersten Schritt (① in Abbildung 40) der hydrophobe Kern durch eine Mutation einer ihn bildenden „kleinen“ zu einer „großen“ Aminosäure soweit destabilisiert werden, dass das Protein inaktiv vorliegen würde. In der darauffolgenden Proteinevolution (②) sollten kompensierende Mutationen selektiert werden, die die Rückkehr zu einem intakten Protein zuließen. Zur Selektion auf intakte Proteinmutanten sollte die Zunahme der Bindungsaffinität eines Derivates des Liganden p40 [220], Pep1 genannt (Ac-Ala-Pro-Thr-Tyr-Ser-Pro-Pro-Pro-Gly-Gly-Arg-OH), genutzt werden. Nach der Etablierung einer erneut stabilen SH3-Domäne, des ersten wichtigen Teilschrittes, sollte die Seitenkette der „großen“ Aminosäure durch Mutation in Gly oder Ala entfernt werden (③), so dass die beabsichtigte Kavität entstünde. Die gemäß Arbeiten mit anderen Proteinen (z. B. [233]) mit hoher Wahrscheinlichkeit zumindest teilweise kollabieren würde. Schließlich sollte aus einer Bibliothek organischer Moleküle dasjenige ermittelt werden, das durch Bindung in der *de novo*-Bindestelle den hydrophoben Kern und dadurch die Proteingestaltstruktur soweit stabilisiere, dass ein aktives Protein vorläge (④).

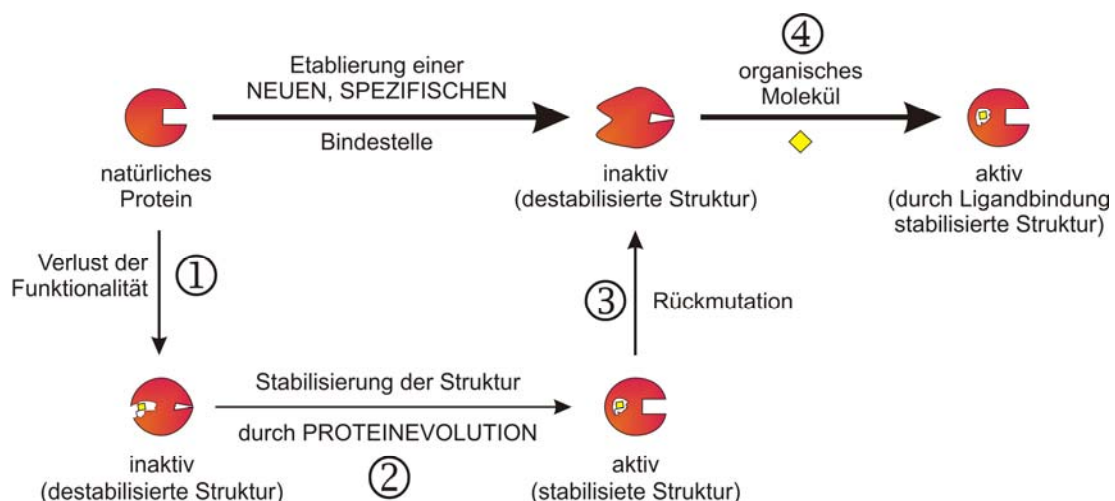


Abbildung 40. Schematischer Ablauf der einzelnen Projektphasen, um eine künstliche Ligand-Bindestelle in der Proteinstruktur der SH3-Domäne zu etablieren. Durch die Mutation einer kleinen in eine sterisch anspruchsvolle Aminosäure wird die Struktur des Proteins destabilisiert (①). Mit Hilfe der Proteinevolution werden kompensierende Mutationen gesucht (②). Nach erfolgreicher Selektion wird die sterisch anspruchsvolle Aminosäure in Ala oder Gly zurückmutiert (③). Das erneut destabilisierte Protein wird durch Bindung eines organischen Moleküls strukturell stabilisiert (④).

5.1. Vorarbeiten

5.1.1. Expression der natürlichen SH3-Domäne und der Ala4-Mutanten

Durch Punktmutationen auf DNA-Ebene (⊙ in Abbildung 40) wurde die natürliche SH3-Domäne (**1**, nat. SH3) der c-Abl Tyrosinkinase in drei Mutanten überführt. Diese Mutanten besaßen an Position 4 der Aminosäuresequenz anstelle des Ala entweder Trp (**2**, A4W) oder Phe (**3**, A4F) sowie Val (**4**, A4V). Da alle Proteine am C-Terminus einen His₆-Tag besaßen, konnte über einen Western-Blot des Gesamtzellextraktes vor und nach Induktion der Proteinexpression mit IPTG durch den PentaHis-Antikörper die Bildung der Fusionsproteine spezifisch nachgewiesen werden (Abbildung 41).

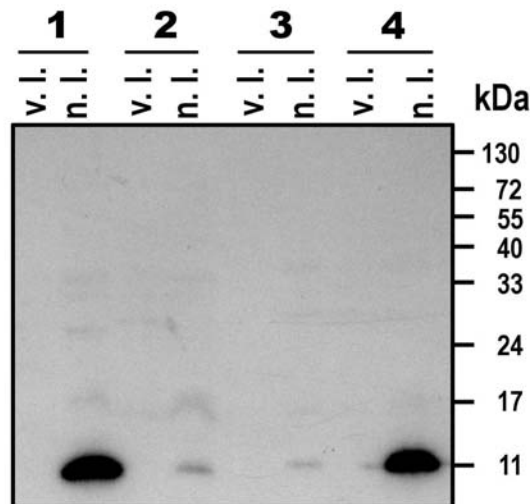


Abbildung 41. Western-Blot gegen den His₆-Tag der Proteinkonstrukte 1 bis 4. Es wurde jeweils eine Probe vor und nach IPTG-Induktion aufgetragen (**1**: nat. SH3-Domäne, **2**: Trp4-, **3**: Phe4- und **4**: Val4-Mutante).

Abbildung 41 zeigte, dass die Val-Mutante (**4**) eine ähnlich starke Proteinexpression wie die natürliche SH3-Domäne (**1**) besaß. Im Gegensatz dazu ist bei der Trp- (**2**) und Phe-Mutante (**3**) nur eine sehr schwache Proteinexpression detektierbar. Hierfür sind zwei Erklärungen denkbar. Zum einen könnte eine allgemein schwach ausgeprägte Expression der beiden Proteine als Ursache angeführt werden. Zum anderen könnten die Bakterienzellen durch Proteolyse die Konstrukte **2** (A4W) und **3** (A4F) abgebaut haben. Dies kann nun als Indiz gewertet werden, dass evtl. die Proteinmutanten **2** (A4W) und **3** (A4F) bezüglich ihrer Struktur nicht stabil sondern fehlgefaltet vorlagen. Ein Umstand der im ersten Schritt des Projektes 1 (Abbildung 40) gewünscht wäre, um mittels Proteinevolution kompensierende Mutationen zu selektieren, die die Struktur und Aktivität der SH3-Domäne wiederherstellten.

Andererseits lieferte die Expression der Val-Mutante (**4**) eine Möglichkeit, diese neben der natürlichen SH3-Domäne (**1**) rekombinant herzustellen, aufzureinigen und biochemisch zu charakterisieren (Abbildung 42). Dazu wurden beide Proteine in *E. coli*-Zellen überexprimiert und aus dem Zellaufschluss mittels Ni^{2+} -Affinitäts- sowie anschließender Gelfiltrationschromatographie aufgereinigt. Schließlich wurden aus 600 mL Kulturmedium 597,7 μg (68,9 mmol) **1** (nat. SH3) und 232,6 μg (26,7 mmol) **4** (A4V) erhalten.

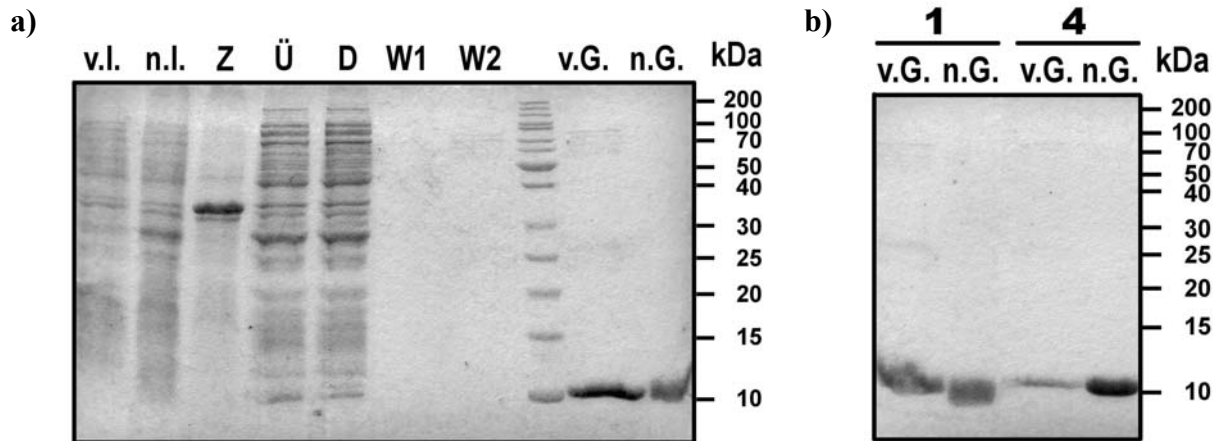


Abbildung 42. SDS-Gel zur Kontrolle der Aufreinigung von Protein 1 und 4. a) Exemplarisches SDS-Gel des Verlaufes der Aufreinigung von Protein **1** (v.l.: vor Induktion; n.l.: nach Induktion; Z: Zelltrümmer; Ü: Überstand der Zentrifugation nach Zellaufschluss; D: Durchfluss der Ni^{2+} -Säule; W1, W2: Waschfraktionen; v.G.: vor Gelfiltration (Eluat der Ni^{2+} -Säule); n.G.: nach Gelfiltration). b) Vergleich Eluat der Ni^{2+} -Säule (v.G.) und der Gelfiltration (n.G.) für die Proteine **1** (nat. SH3) und **4** (A4V).

5.1.2. Bestimmung der Dissoziationskonstanten (K_d)

Durch die Bindung des p40-Analogons Pep1 wird die Lösungsmittel-Zugänglichkeit einer in der Bindestelle der SH3-Domäne gelegenen Tryptophan-Seitenkette allmählich aufgehoben. Die somit bewirkte Änderung in der chemischen Umgebung des Trp35 führt zu einer Blauverschiebung des Maximums des Fluoreszenzemissionsspektrums. Die Auftragung der Änderung der Fluoreszenzintensität bei einer bestimmten Wellenlänge gegen die Konzentration des hinzugefügten Liganden erlaubt, dass gemäß Gl. 9 mit Hilfe eines nichtlinearen, quadratischen Fits durch die Messpunkte die Dissoziationskonstante bestimmt werden kann.

Pep1: Ac-Ala-Pro-Thr-Tyr-Ser-Pro-Pro-
Pro-Pro-Pro-Gly-Gly-Arg-OH

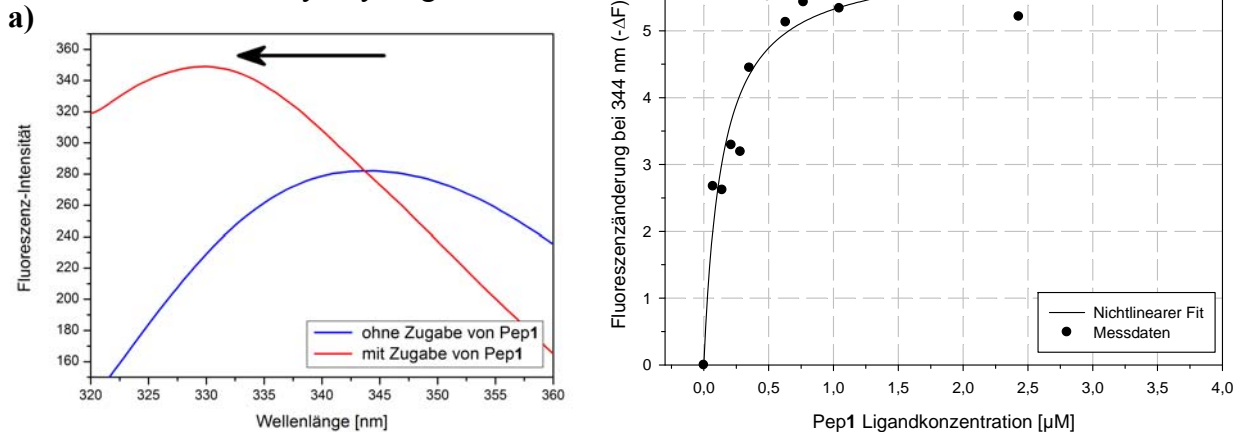


Abbildung 43. Messergebnisse und Auswertung der Trp-Fluoreszenztitration. a) Durch Zugabe von Ligand Pep1 (links oben) verschiebt sich das Maximum der Fluoreszenz-Intensität zu kleineren Wellenlängen. b) Auftragung der Differenz in der Intensität beim Maximum der blauen Kurve ($-\Delta F$) gegen die Pep1-Konzentration ermöglicht die Bestimmung der Dissoziationskonstante gemäß Gl. 9.

Aus fünf voneinander unabhängigen Messreihen erhielt man für die Dissoziationskonstante der SH3-Domäne **1** (natürlich) einen Wert von 103 ± 35 nM. Die für das Protein **4** (A4V) durchgeführten Messreihen ergaben einen K_d -Wert von 112 ± 49 nM.

Aus dem Vergleich beider Werte kann man den Schluss ziehen, dass die Oberfläche beider SH3-Domänen im Bereich der Pep1-Binderegion vermutlich richtig gefaltet vorliegen. Außerdem stellten Pisabarro und Serrano für das System aus c-Abl SH3-Domäne und p40-Peptid ebenfalls durch Messung der Abschwächung der Trp-Fluoreszenzemission einen K_d -Wert von 400 ± 100 nM fest [220]. Ein Vergleich der experimentell gewonnenen Dissoziationskonstanten der SH3-Domänen **1** (natürlich) und **4** (A4V) mit dem Literaturwert zeigt eine Abweichung um den Faktor vier. Ein Umstand der vermutlich mit den Abweichungen in der Sequenz der genutzten SH3-Domänen besonders bezüglich ihres N- und C-Terminus erklärt werden kann. Außerdem ist der Ligand Pep1 am C-Terminus zur Verbesserung der Löslichkeit während der Synthese um die Aminosäuren Gly-Gly-Arg verlängert worden. Da jedoch die experimentellen K_d -Werte als auch der Literaturwert dieselbe Größenordnung besitzen, kann mit hoher Wahrscheinlichkeit davon ausgegangen werden, dass sowohl **1** (nat. SH3) als auch **4** (A4V) eine intakte Proteingesamtstruktur aufweisen.

5.1.3. Analyse der Sekundärstruktur durch CD-Spektroskopie

Die Anwendung der Circular dichroismus-Spektroskopie (CD-Spektroskopie) ermöglicht die Bestimmung der Sekundärstruktur von Peptiden und Proteinen, da α -Helix-, β -Faltblatt- und unstrukturierte Bereiche links bzw. rechts zirkular polarisiertes Licht unterschiedlich stark absorbieren. Dieser Unterschied kann gemessen und mit Hilfe von Gl. 10 in die Elliptizität umgerechnet werden. Je nach Aufbau der Proteine zeigt das erhaltene Spektrum eine Überlagerung der Kurven der drei Sekundärstruktur-Motive.

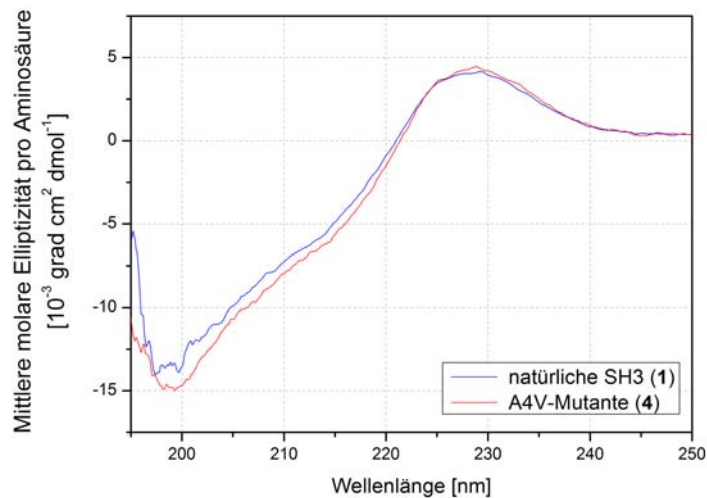


Abbildung 44. CD-Spektren der natürlichen SH3-Domäne (1) und der A4V-Mutante (4). Die experimentell ermittelte Elliptizität wurde in die mittlere molare Elliptizität pro Aminosäure umgerechnet, um den Vergleich der erhaltenen Spektren zu ermöglichen.

Die experimentell zugängliche Elliptizität (θ_λ) kann nach Umrechnung (siehe Kapitel 4.5.6) in die mittlere molare Elliptizität pro Aminosäure ($[\theta]_{\text{MRW}}$) gegen die Wellenlänge des einfallenden, ultravioletten Lichtes aufgetragen werden. Das in Abbildung 44 gezeigte Spektrum der SH3-Domäne 1 (nat.) besitzt große Übereinstimmung mit den aus der Literatur bekannten Spektren der natürlichen c-Abl SH3-Domäne [261]. In der Literatur [261] wird angenommen, dass das Maximum bei 229 nm aus der für SH3-Domänen eher unüblichen Verteilung der Tryptophane resultiert. In der Regel besitzen SH3-Domänen im Bereich von Position 35 ein oder zwei Tryptophanreste. Hingegen besitzt die Abl SH3-Domäne Tryptophane an Position 35 und 46. Ein Indiz zur Bestätigung dieser Theorie liefern die Ergebnisse neuerer Untersuchungen an Varianten der humanen Nck2 SH3-Domäne [262]. Ausschließlich Variante 2, die als einzige Nck2 SH3-Domäne eine zur Abl SH3-Domäne ähnliche Verteilung der Tryptophane aufweist, besitzt in ihrem CD-Spektrum ein Maximum bei ca. 230 nm. Alle übrigen Varianten weisen das Maximum nicht auf.

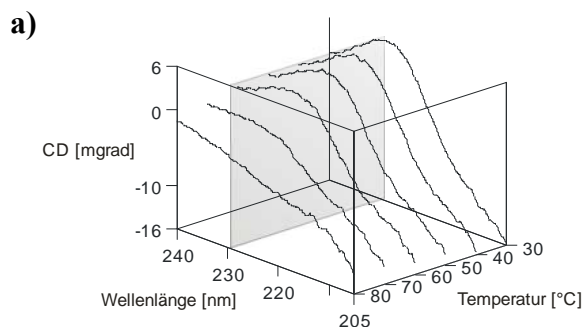
Die Untersuchung der A4V-Mutante (Abbildung 44) zeigte nur geringe strukturelle Unterschiede zur natürlichen SH3-Domäne. Lediglich der schnellere Abfall der Kurve zum Minimum bei ca. 200 nm hin, kann als Indiz gewertet werden, dass die Mutante einen leicht größeren Anteil ungeordneter Bereiche in ihrer Proteinstruktur besitzt.

5.1.4. Bestimmung der Schmelzpunkte

Denaturierungen von Proteinen durch ansteigende Temperaturen gehen mit Veränderungen im CD-Spektrum einher. Signifikante Veränderungen in der gemessenen Elliptizität gegen die Temperatur aufgetragen, ergeben einen Graphen, aus dem die Schmelztemperatur des untersuchten Proteins abgeleitet werden kann.

Im vorliegenden Fall konnte die Einebnung des Maximums bei 229 nm (Abbildung 45) genutzt werden um temperaturbedingte Denaturierungsvorgänge zu untersuchen. Durch die in Abhängigkeit der Temperatur erhaltene Schar an Messungen wurde bei 229 nm eine Ebene gelegt. Eine Auftragung der in der Ebene gelegenen Messungspunkte der Elliptizität gegen die Temperatur ermöglicht die Bildung einer Schmelzkurve. Dieser kann auf der Hälfte des nichtlinearen Bereiches der Schmelzpunkt entnommen werden.

Aus den Untersuchungen mit Protein **1** (nat. SH3) und **4** (A4V) (Abbildung 45) resultierten Schmelzpunkte von $71,50 \pm 0,57^\circ\text{C}$ bzw. $66,54 \pm 0,16^\circ\text{C}$. Der Unterschied von ca. 5°C weist auf einen weniger kompakten hydrophoben Kern im Falle der A4V-Mutante hin. Außerdem kann aus dem Verlauf der Schmelzkurve gefolgert werden, dass die thermische Proteinfaltung der SH3-Domänen ein kooperativer Vorgang ist, weil zwischen der vollständig gefalteten (20°C) bzw. entfalteten Struktur (95°C) keine Zwischenstufen zu detektieren waren.



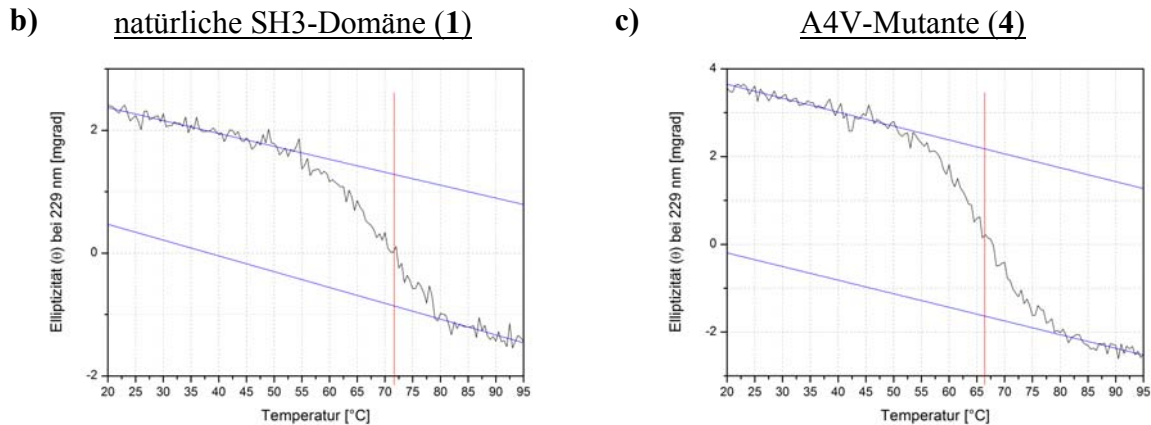


Abbildung 45. CD-Spektren und Auswertung der Bestimmung des Schmelzpunktes. a) Dreidimensionale Darstellung der Elliptizität in Abhängigkeit der Wellenlänge und Temperatur. In 5°C-Schritten wurde jeweils ein CD-Spektrum im Bereich von 205 bis 240 nm aufgenommen. Eine Ebene durch das Maximum bei 20°C und 229 nm, das bei ansteigender Temperatur abflacht, gelegt, resultiert in den in b) (nat. SH3) und c) (A4V) dargestellten Graphen, aus denen die Schmelztemperaturen ermittelt werden können (rote senkrechte Linie). Die blauen Linien beschreiben den linearen Bereich der Schmelzkurven.

5.1.5. Die A4W/I18A-Doppelmutante der natürlichen SH3-Domäne

Neben der Charakterisierung der beiden exprimierbaren SH3-Domänen stellte sich bei Betrachtung der Kristallstruktur der c-Abl SH3-Domäne die Frage, ob es möglich sei, den notwendigen Platz für die Seitenkette der „neuen“ Aminosäure durch rationelle Mutation bestimmter Aminosäuren des hydrophoben Kernes zu gewinnen. Mutationsstudien und rudimentäre Energieminimierungen mit dem Programm Pymol [225] legten die Vermutung nahe, dass die Mutation von Ile18 zu Ala genug Raum schaffen könnte, um die Trp-Seitenkette in der Struktur einer intakten SH3-Domäne etablieren zu können. Daher wurde das Konstrukt **5** mit den Mutationen A4W und I18A kloniert und die Expression in *E. coli*-Zellen gemäß Kapitel 5.1.1 mit einem Western Blot überprüft (Abbildung 46).

Der Western-Blot gegen den His₆-Tag (Abbildung 46) zeigte, dass die Menge an exprimiertem Protein sowohl bei der A4W- (**2**) als auch bei der A4W/I18A-Mutante (**5**) auf demselben niedrigen Niveau anzusiedeln war. Daher kann gemutmaßt werden, dass die zweite Mutation nicht genug Raum im hydrophoben Kern der SH3-Domäne gewinnen konnte, um ein strukturell intaktes Protein zu bilden oder aber dass andere Effekte sich negativ auf die Proteinexpression und/oder Faltung ausgewirkt haben.

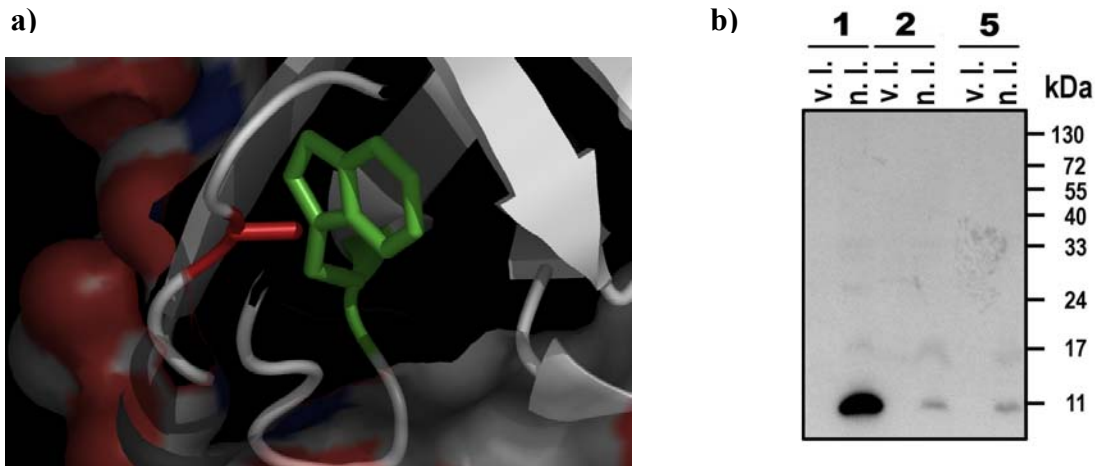


Abbildung 46. 3D-Struktur des hydrophoben Kerns der Doppelmutante und ein Western-Blot gegen den His₆-Tag zur Überprüfung der Proteinexpression. a) Die theoretische Oberfläche der A4W/I18A-Doppelmutante der SH3-Domäne (grau) wurde soweit geöffnet, dass die Positionen der Mutationen sichtbar sind (A4W: grün; I18A: rot; erstellt mit Pymol, [225]). b) Im Western-Blot (anti-His₆) wurde durch Auftragung von Proben vor und nach IPTG-Induktion der Konstrukte **1** (nat. SH3), **2** (A4W) und **5** (A4W/I18A) deren Proteinexpression untersucht.

5.2. Proteinevolution mit Hilfe eines Hefe-2-Hybridsystems

Da der rationale Ansatz über die Doppelmutante zu keinem positiven Ergebnis führte, sollten für eine sich anschließende Proteinevolution zwei verschiedene Arten von DNA-Bibliotheken generiert werden. Die Bibliothek 1 war das Ergebnis einer epPCR mit der gesamten Sequenz der SH3-Domäne. Bei der Bildung der zweiten Bibliothek wurde ein semirationaler Ansatz gewählt, indem nur einige Aminosäuren, die maßgeblich den hydrophoben Kern bilden, mutiert wurden. Diese Mutationen wurden durch eine rekursive PCR erzeugt [241].

Als Methode zur Proteinevolution wurde das Hefe-2-Hybridsystem (siehe Kapitel 1.3.7) gewählt, da hier auf einfache Weise auch schwache Protein/Ligand-Wechselwirkungen untersucht werden können.

5.2.1. epPCR zur Mutagenese der gesamten SH3-Sequenz (Bibliothek 1)

Die DNA-Bibliothek 1 ist das Ergebnis einer epPCR mit dem „GeneMorph II Random Mutagenesis Kit“ der Firma *Stratagene*. Als Templat für die PCR diente die gesamte DNA-Sequenz der SH3-Domäne **3** (A4F) beginnend ab dem für Ala10 kodierenden Kodon. Diese Mutante der SH3-Domäne wurde gewählt, da Vorversuche gezeigt hatten, dass bereits die

Mutation zu Phe eine weitreichende Destabilisierung der richtigen Faltung des hydrophoben Kerns bewirkte.

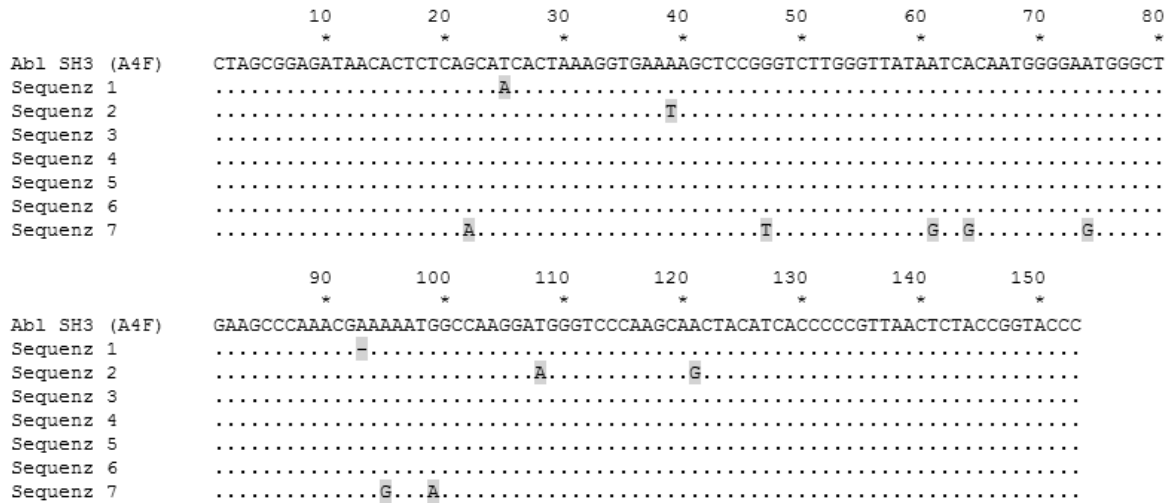


Abbildung 47. Alignment der Sequenzen von 7 zufällig ausgewählten Kolonien zur Bewertung der DNA-Bibliothek. Grau unterlegt sind die Abweichungen von der DNA-Sequenz der A4F-Mutante.

Die während der epPCR entstandene DNA-Bibliothek wurde in das Plasmid der A4F-Mutante hineingesetzt und von den nach Transformation gebildeten Bakterienkolonien 7 für die Sequenzierung der DNA zufällig ausgewählt. Das in Abbildung 47 gezeigte Alignment der Sequenzen der ausgewählten Kolonien mit derjenigen der A4F-Mutante der c-Abl SH3-Domäne besitzt 7 Transitionen, 4 Transversionen und 1 Deletion. Transitionen der Art Adenin (A) → Guanin (G) bzw. Thymin (T) → Cytosin (C) sind 5-mal, der Art G→A bzw. C→T sind 2-mal in der Auswahl vorhanden. Im Falle der Transversionen kann 3-mal A→T bzw. T→A und 1-mal G→T bzw. C→A beobachtet werden. Mit Hilfe des Handbuches des eingesetzten „GeneMorph II Random Mutagenesis Kits“ ließ sich die durchschnittliche Mutationsrate der Bibliothek 1 berechnen [17]. Die Mutationsrate wurde auf ca. 17 Mutationen pro 1 kb oder auf die amplifizierte DNA-Sequenz umgerechnet auf durchschnittlich ca. 3 Mutationen bestimmt. Allerdings ist nur eine eingeschränkte Verteilung der Mutationen aus Abbildung 47 ersichtlich. Denn der Sequenz 7 mit 7 Mutationen stehen die Sequenzen 3 bis 6 mit gar keiner Mutation auf das DNA-Templat bezogen gegenüber. Dies zeigt die Schwierigkeit eine hohe, aber auch gleichmäßig verteilte Mutationsrate in einer sehr kurzen DNA-Sequenz von lediglich 153 bp zu erzeugen.

5.2.2. Gezielte Mutationen in der SH3-Domäne durch rekursive PCR

Die Kürze der DNA-Sequenz ist hingegen ein Vorteil beim semirationalen Aufbau der Bibliothek 2 mit der Methode der rekursiven PCR [241]. Hierbei werden synthetische Oligonukleotide so gestaltet, dass sie jeweils einen überlappenden Bereich mit den die Nachbarsequenz bestimmenden Oligonukleotiden besitzen (Abbildung 48). Der Bereich in der Mitte der DNA-Sequenz kann hingegen frei variiert werden.

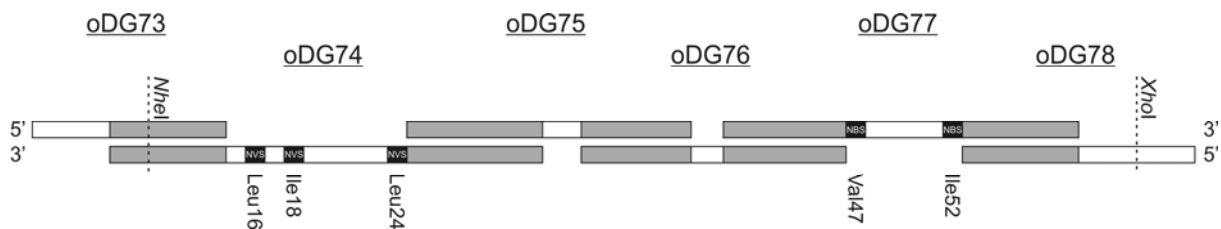
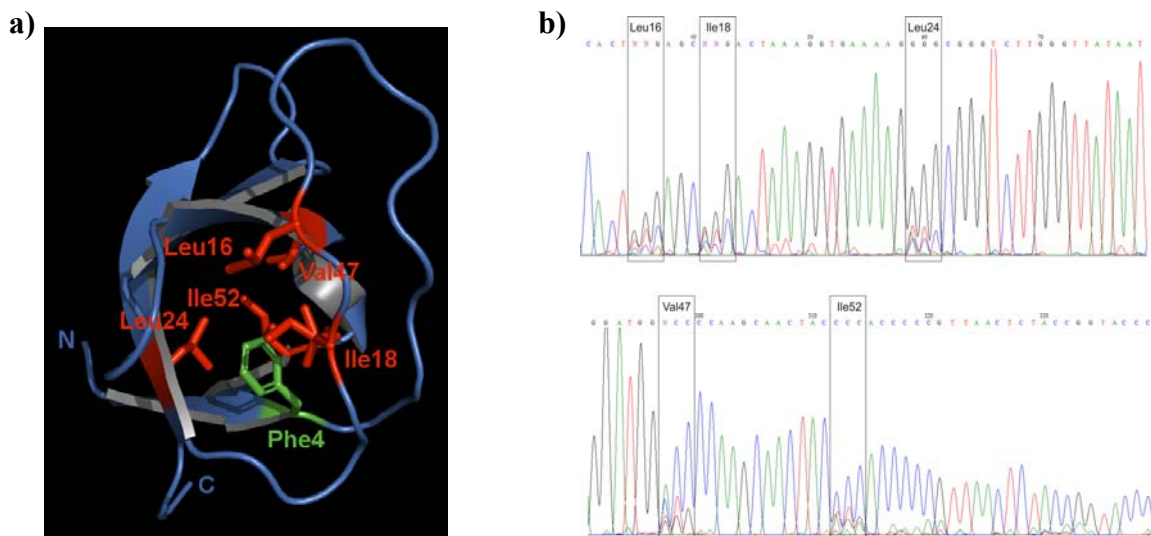


Abbildung 48. Schematische Darstellung der im Rahmen der rekursiven PCR verwendeten Oligonukleotide. Oberhalb der Oligonukleotide sind die Namen genannt unter denen in Tabelle 14 die Sequenz nachgeschlagen werden kann. Die überlappenden Bereiche sind grau und die Positionen der mutierten Aminosäuren schwarz gefärbt. Neben den genutzten Aminosäure-Positionen sind auch die Restriktionsenzyme *NheI* und *XhoI* aufgeführt, über die das PCR-Produkt in das Plasmid der A4F-Mutante kloniert wurde. Die degenerierten Basen NBS bzw. NVS sind ebenfalls gezeigt (N = alle 4 Basen; B = C, G, T; V = C, G, A und S = C, G).

Nach dieser Methode wurden die Kodons von 5 Aminosäuren (Leu16, Ile18, Leu24, Val47 und Ile52), die maßgeblich den hydrophoben Kern bilden, gegen die Basensequenz NBS (N = alle 4 Basen, B = C, G, T und S = C, G) ausgetauscht (Abbildung 48). Die Basensequenz NBS ermöglicht an den entsprechenden Positionen 13 vorrangig hydrophobe Aminosäuren und schließt Stop-Kodons aus.



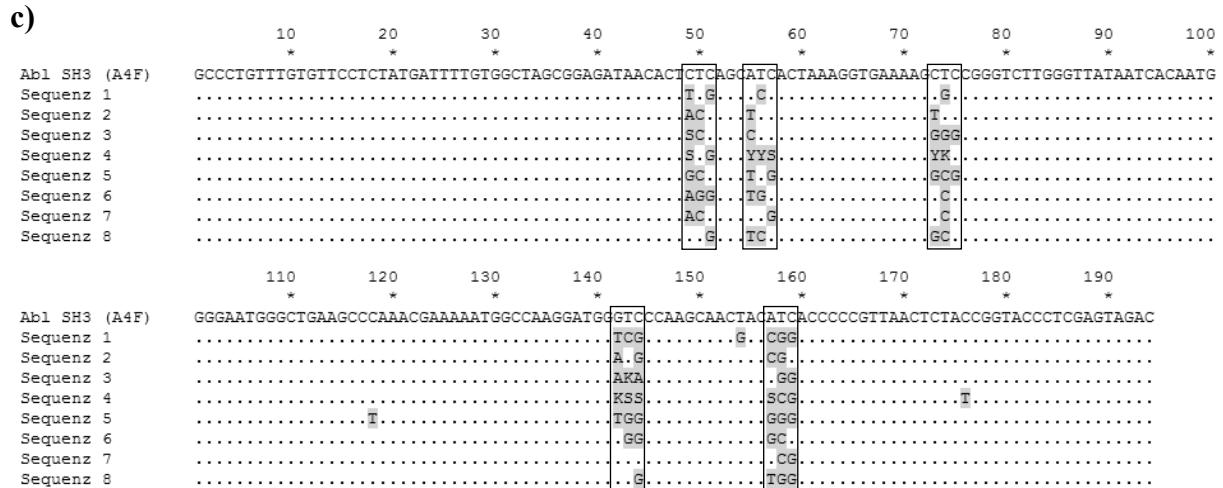


Abbildung 49. Theoretische Struktur der A4F-Mutante mit den durch rekursive PCR veränderten Aminosäuren (Leu16, Ile18, Leu24, Val47 und Ile52) und Informationen zur erstellten DNA-Bibliothek. a) Einblick in den Aufbau des hydrophoben Kerns der A4F-Mutante (Phe4: grün; Protein-Rückgrat: blau) und die mutierten 5 Aminosäuren (rot) (erstellt mit Pymol, [225]). b) Die Sequenzierung des PCR-Produktes zeigt an den Positionen der degenerierten Basen die erwarteten Signale. c) Das Alignment von 8 Sequenzen zufällig ausgewählter Kolonien aus der A4F-Mutantenbibliothek zeigen überwiegend nur an den Positionen der degenerierten Basen Mutationen (K = G, T; S = C, G und Y = C, T).

Die DNA-Sequenzierung des Produktes der rekursiven PCR zeigt in den meisten Fällen an den variierten Positionen die erwarteten Basen (Abbildung 49b)). An anderen Positionen ist außerdem noch ein schwaches Hintergrund-Signal in der Sequenzierungsspur zu detektieren. Weiterhin zeigt die Sequenzierung von 8 zufällig ausgewählten Kolonien neben den gewünschten Mutationen einige Punktmutationen an nicht beabsichtigten Positionen, die entweder aus Fehlern der Polymerase oder aus Synthesefehlern der Oligonukleotide resultieren (Abbildung 49c)). Abschließend kann festgehalten werden, dass die DNA-Bibliothek 1 und 2 erfolgreich hergestellt wurden und in den folgenden Proteinevolutions-Experimenten eingesetzt werden konnten.

5.2.3. Test auf Wachstum, Autoaktivierung und Einschleusung in den Zellkern

Das Hefe-2-Hybridsystem zeichnet sich durch eine einfache Analysemöglichkeit auch schwacher Protein/Ligand-Interaktionen aus. Deshalb wurde das Hybrid **6** (nat. SH3) bzw. **7** (A4F) aus der SH3-Domäne und der DNA-bindenden Domäne LexA hergestellt. Den Gegenpart bildete das Hybrid **8** aus der Aktivator-domäne B42 und der Sequenz des Liganden Pep1 (Ac-APTYSPPPPGGR). Die Wechselwirkung zwischen der SH3-Domäne und dem Liganden Pep1 bringt die Aktivator-domäne in räumliche Nähe zur DNA-gebundenen LexA-Domäne, so dass die Transkription eines Reportergens (*lacZ* oder *LEU2*) initiiert wird

(Abbildung 50). Hierbei kodiert *lacZ* für das Enzym β -Galaktosidase und *LEU2* ermöglicht den Hefezellen in Medium das kein Leucin enthält selbst die Aminosäure zu produzieren, so dass die Transkription von *LEU2* ein Überleben der Hefezellen in oder auf Leu-defizientem Medium bewirkt.

Im Falle der A4F-Mutante sollte eine Interaktion mit Pep1 nicht möglich sein und deshalb auch keine Transkription des Reportergens geschehen. Erst das Auffinden einer kompensierenden Mutation in der DNA-Bibliothek sollte eine Stabilisierung der Proteinstruktur bewirken, die mit der erneuten Möglichkeit der Interaktion mit dem Pep1-Hybrid einherging und daher auch die Transkription des Reportergens erneut initiiert werden konnte.

Neben Abbildung 50 soll auch Tabelle 3, die einen kurzen Überblick über die eingesetzten Konstrukte sowie die Auxotrophien, Antibiotika-Resistenzen und Promotoren ihrer Plasmide vermittelt, zu einem besseren Verständnis des genutzten Hefe-2-Hybridsystems beitragen.

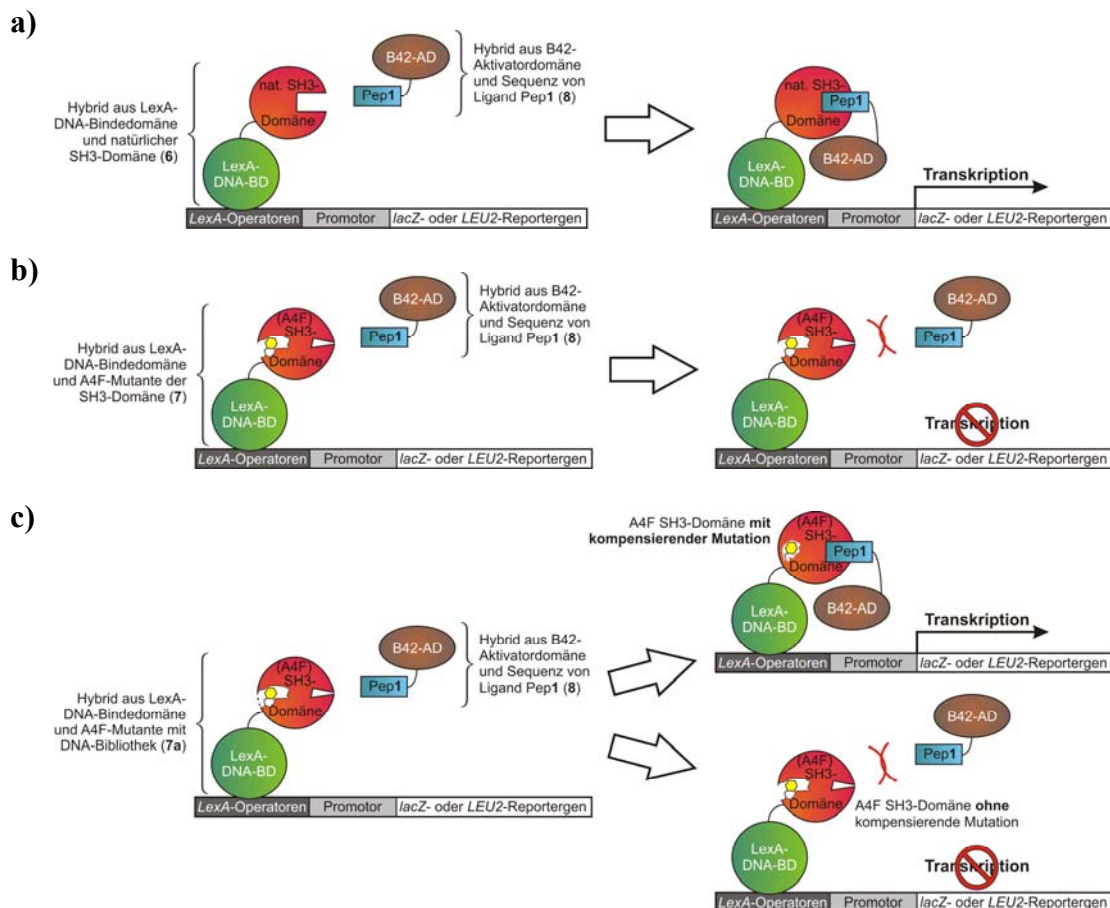


Abbildung 50. Schematische Darstellung der durchgeführten Hefe-2-Hybridexperimente. a) Die Interaktion zwischen dem Hybrid der DNA-Binde- und der natürlichen SH3-Domäne (6) sowie dem Hybrid der Aktivator-domäne und der SH3-Erkennungssequenz aus Pep1 (8) dient zur Positiv-Kontrolle, die sich in der Transkription der Reportergene äußert. b) Die Negativ-Kontrolle bildet die A4F-Mutante der SH3-Domäne (Hybrid 7), die durch Unterbinden der Wechselwirkung mit der SH3-Erkennungssequenz (Hybrid 8) keine Transkription der Reportergene ermöglicht. c) Bei Verwendung des Hybrids 7a mit der A4F-Mutante, die eine DNA-Bibliothek besitzt, entscheidet die Ausbildung einer kompensierenden Mutation über die Möglichkeit einer Interaktion mit dem Hybrid 8 und daher auch über die Transkription der Reportergene, die für ein Überleben der Hefezellen unter Selektionsbedingungen essentiell ist.

Tabelle 3. Überblick über die während der Hefe-2-Hybridexperimente eingesetzten Konstrukte.

Typ	Konstrukt	Promotor	Auxotrophie-Marker	Antibiotika-Resistenz
Positiv-Kontrolle	LexA-Abl SH3 (6)	<i>GAL1</i>	<i>HIS3</i>	Ampicillin
Negativ-Kontrolle	LexA-Abl SH3 (A4F) (7)	<i>GAL1</i>	<i>HIS3</i>	Ampicillin
Bibliothek für kompensierende Mutation(en)	LexA-Abl SH3 (A4F, DNA-Bibliothek) (7a)	<i>GAL1</i>	<i>HIS3</i>	Ampicillin
Interaktionspartner (Beute-Hybrid)	B42 AD-HA Tag-APTYSP PPPGGR (Abl SH3 Erkennungssequenz)-His ₆ (8)	<i>GAL1</i>	<i>TRP1</i>	Ampicillin
Reporter durch Substratumsetzung via β -Galaktosidase	<i>lacZ</i> -Reporterplasmid	<i>LexA_{op} [x8]</i>	<i>URA3</i>	Ampicillin

Abbildung 51 in Kombination mit Tabelle 4 zeigt die ersten Experimente mit den Hefestämmen, die der Nachprüfung dienten, ob die Hefezellen ohne Selektionsdruck sowohl auf Standardmedium-Platten mit Glukose (Inhibierung des *GAL*-Promotors) als auch mit Galaktose/Raffinose (*GAL*-Promotor wird induziert) überhaupt bzw. ähnlich gut wachsen können. Neben der Positiv-Kontrolle (\oplus) wurden auch vier zufällig ausgewählte Kolonien mit dem Hybrid der A4F-Mutante untersucht.

Tabelle 4. Wachstumsexperiment mit verschiedenen Kohlenstoffquellen (vgl. Abbildung 51).

Hefe-stamm	nat. SH3 (6)	A4F-SH3 (7)	Pep1-Hybrid (8)	<i>lacZ</i> -Reporter	Interaktion erwartet?	Wachstum beobachtet?
\oplus	X		X	X	ja	ja
①		X (Kolonie 1)	X	X	nein	ja
②		X (Kolonie 2)	X	X	nein	ja
③		X (Kolonie 3)	X	X	nein	ja
④		X (Kolonie 4)	X	X	nein	ja

(Von Hefen mit der Hybrid-Kombination 7 und 8 wurden 4 zufällig ausgewählte Kolonien untersucht.)

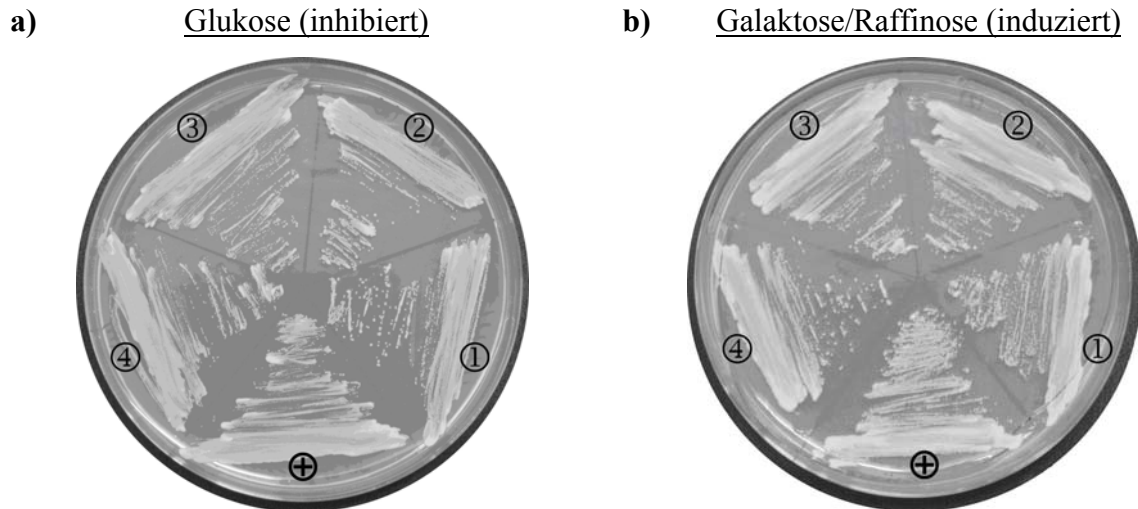


Abbildung 51. Wachstumsexperiment bei verschiedenen Kohlenstoffquellen. Das Medium enthielt Leu, sodass kein Selektionsdruck auf die Hefen ausgeübt wurde. Analysiert wurde das Wachstum der in Tabelle 4 aufgelisteten Hefe-2-Hybridsysteme auf SD-Medium (-Ura/-His/-Trp) mit Glukose (a) bzw. Galaktose/Raffinose (b).

Das Wachstumsexperiment mit den Hefezellen (Abbildung 51) hat zu dem Ergebnis geführt, dass sowohl diejenigen Zellen mit dem System aus Hybrid 6 (nat. SH3) und 8 (Pep1) als auch mit demjenigen der Hybride 7 (A4F) und 8 (Pep1) erfolgreich auf Standardmedium mit Leu (unabhängig vom Zustand des Gal-Promotors) wachsen können. Somit scheint die Wahl der angebotenen Kohlenstoffquelle bei Anwesenheit von Leu im Medium keinen Einfluss auf das Wachstum der Zellen zu besitzen. Weiterhin zeigt das Wachstum auf den genutzten Platten, denen die Aminosäuren Ura, His und Trp im Medium fehlten, dass sich die drei Plasmide des Hefe-2-Hybridsystems in den Zellen befinden und die Gene der Auxotrophiemarker transkribiert werden können.

Bevor Proteinevolutions-Experimente mit einem Hefe-2-Hybridsystem betrieben werden können, ist es notwendig zu überprüfen, ob das Hybrid aus der DNA-bindenden Domäne LexA und im vorliegenden Fall der natürlichen (Protein 6) bzw. A4F-Mutante der SH3-Domäne (Protein 7) eine sogenannte Autoaktivierung der Transkription des Gens *LEU2* bewirken kann (Abbildung 52). Im Falle einer Autoaktivierung ist die Anwesenheit des Hybrids aus der Aktivator-domäne B42 und der Sequenz des Pep1 (Protein 8) nicht notwendig, um die Transkription des Reportergens zu initiieren. Dadurch wird die im verwendeten Hefe-2-Hybridsystem als Leben/Tod-Selektion genutzte Transkription des Reportergens *LEU2* umgangen. Die während der Untersuchung genutzten Kombinationen der Hybridproteine und „leeren“ Plasmide ist in Tabelle 5 verzeichnet, wobei auch die theoretische Erwartung bezüglich der Autoaktivierung vermerkt ist.

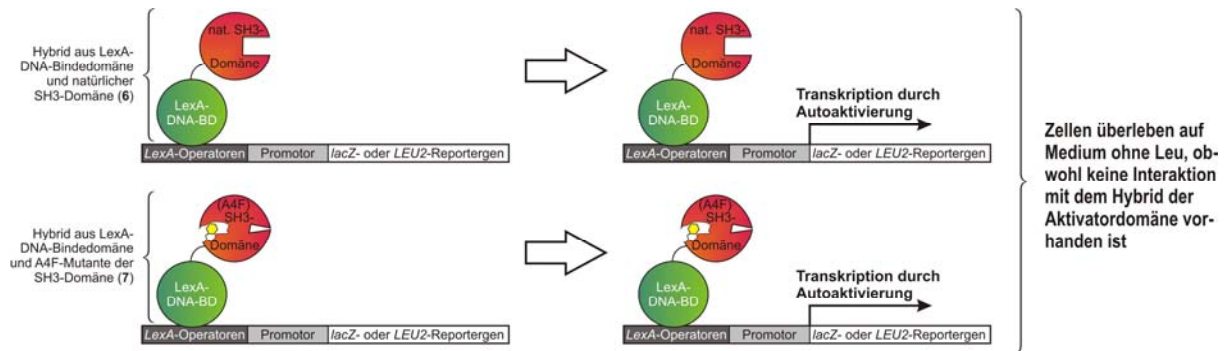


Abbildung 52. Schematische Darstellung des Prozesses der Autoaktivierung. Allein durch das Hybrid der DNA-bindenden Domäne kann bei Autoaktivierung die Transkription der Reportergene initiiert werden. Hierbei übernimmt der Fusionspartner die SH3-Domäne die Aufgabe der Aktivatordomäne.

Tabelle 5. Untersuchung auf Autoaktivierung der Transkription von *LEU2* (vgl. Abbildung 53).

Hefe-stamm	pgILDA (leer)	pB42AD (leer)	nat. SH3 (6)	A4F-SH3 (7)	Pep1-Hybrid (8)	Reporter lacZ-	Interaktion erwartet?	Wachstum beobachtet?
⊕			X		X	X	ja	ja
①			X			X	nein	nein
②		X	X			X	nein	nein
③					X	X	nein	nein
④	X				X	X	nein	nein
⑤				X (Kolonie 1)	X	X	nein	nein
⑥				X (Kolonie 2)	X	X	nein	nein
⑦				X (Kolonie 3)	X	X	nein	nein
⑧				X (Kolonie 4)	X	X	nein	nein
⑨				X (Kolonie 1)		X	nein	nein
⑩				X (Kolonie 2)		X	nein	nein
⊖1	X	X				X	nein	nein
⊖2		X				X	nein	nein

(Von Hefen mit der Hybrid-Kombination 7 und 8 wurden 4 zufällig ausgewählte Kolonien untersucht. Im Falle von Hefezellen, die nur das Hybrid 7 exprimieren, wurde eine Doppelbestimmung durchgeführt.)

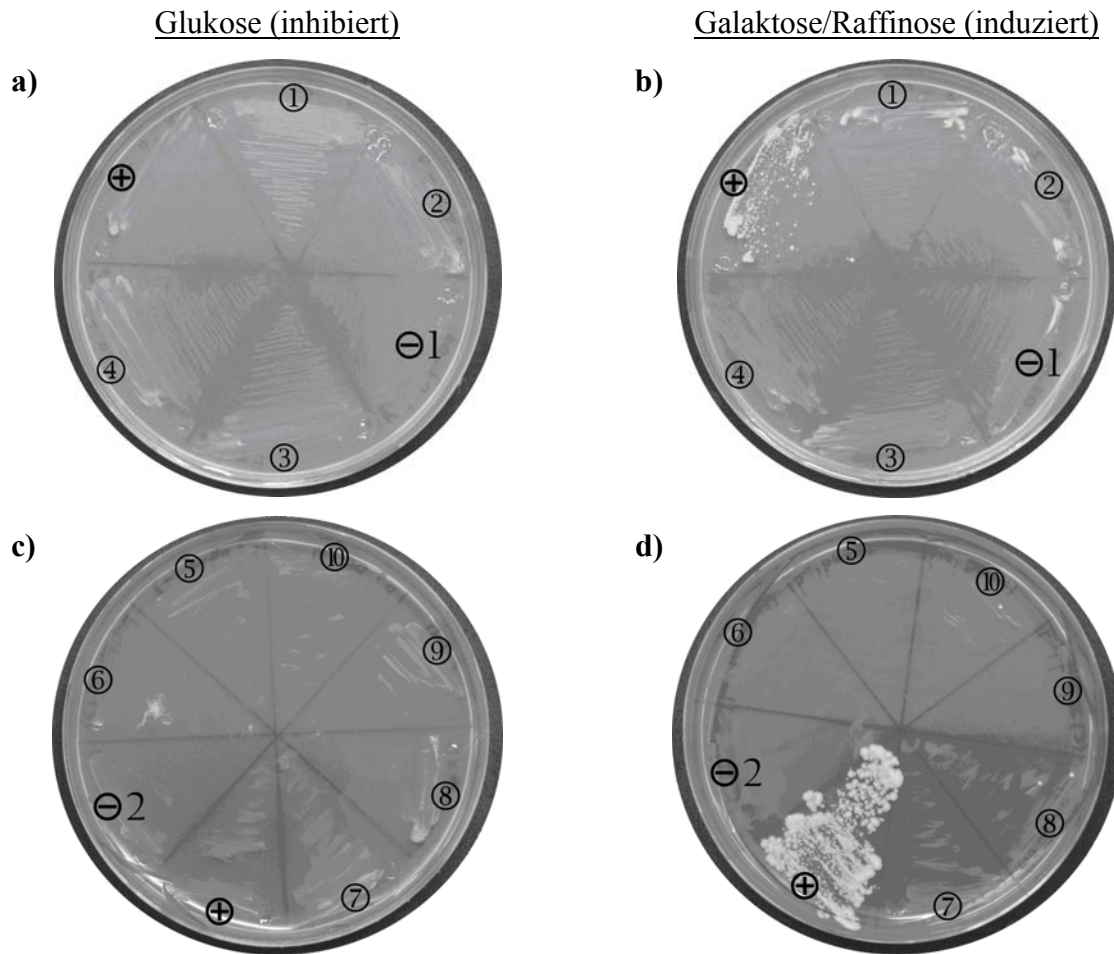


Abbildung 53. Untersuchungen zur Autoaktivierung der Transkription von *LEU2* durch die LexA-Hybride 6 (nat. SH3) und 7 (A4F). Es wurden die in Tabelle 5 genannten Plasmid-Kombinationen getestet. Die Platten bestanden aus SD-Festmedium (-Ura/-His/-Leu) mit Glukose (a und c: *GAL1*-Promotor inhibiert) oder Galaktose/Raffinose (b und d: *GAL1*-Promotor induziert).

Im Bezug auf Hybrid 6 (nat. SH3), verdeutlicht Abbildung 53 drei Tatsachen. Erstens wird der *GAL*-Promotor mit Glukose effektiv herunterreguliert (Abbildung 53a) und c)), sodass das im Genom der Hefezelle verankerte *LEU2* nicht die für den dritten Schritt der Leucin-Biosynthese notwendige β -*iso*-Propylmalat-Dehydrogenase [263] exprimieren kann. Zweitens bewirkt der Austausch von Glukose gegen Galaktose/Raffinose eine Induktion des *GAL*-Promotors (Abbildung 53b) und d)). Allerdings sind die Hefezellen drittens auf Leu-deffizientem SD-Medium nur überlebensfähig sofern sich auch das Hybrid 8 im Zellkern der Hefezelle befindet und somit das Hefe-2-Hybridsystem vollständig ist (\oplus). Daher kann zum einen eine Autoaktivierung der Transkription von *LEU2* durch die alleinige Anwesenheit des LexA-Hybrids 6 (nat. SH3) (\odot) ausgeschlossen werden. Zum anderen ist die *in vitro* Interaktion zwischen der natürlichen SH3-Domäne und dem Liganden Pep1 auch im Zellkern von Hefen mit den Hybriden 6 (nat. SH3) und 8 (Pep1) möglich.

Für das Hybrid 7 der A4F-Mutante der SH3-Domäne ist die Bildung überlebensfähiger Hefezellen auf den Platten mit induziertem *GAL*-Promotor in Anwesenheit des Hybrids der Aktivator-domäne (8) nicht möglich (⑤ bis ⑧). Dies deutet daraufhin, dass durch die wahrscheinliche Fehlfaltung der Mutante keine Interaktion mit der Sequenz des Liganden Pep1 entsteht. Bei Abwesenheit des Hybrids 8 (Pep1) ist auf den Platten mit Galaktose induziertem Promotor keine Autoaktivierung bei den untersuchten Klonen mit Hybrid 7 (A4F) beobachtbar (⑨ und ⑩).

Neben dem Test auf Autoaktivierung und Einschleusung beider Hybride des jeweiligen Systems in den Zellkern, kann die Aktivität des Hefe-2-Hybridsystems auch optisch durch Umsetzung des Substrates X-Gal (5-Brom-4-chlor-3-indoxyl- β -D-galaktopyranosid) verdeutlicht werden. Dazu ist die Expression der auf dem dritten Plasmid unter Kontrolle des LexA-Operators kodierten β -Galaktosidase notwendig. Im sogenannten Kolonie-Lift Filterassay (Kapitel 4.2.3) wird die in den Zellen exprimierte β -Galaktosidase durch Aufschluss der Hefezellen freigesetzt und kann so das Substrat X-Gal zu einem Vorläufer des blauen Farbstoffes 5,5'-Dibrom-4,4'-dichlor-indigo und Galaktose spalten. Alle im Rahmen des Kolonie-Lift Filterassay untersuchten Hefe-2-Hybridsysteme sind in Tabelle 6 aufgeführt. Die Positiv-Kontrolle bildete das System aus Hybrid 6 (nat. SH3) und 8 (Pep1), die Negativ-Kontrolle bestand lediglich aus dem Reporterplasmid p8opLacZ und dem „leeren“ Vektor der Aktivator-domäne. Die Ansätze 5 und 6 sollen eine Aussage über die Autoaktivierung der *lacZ*-Transkription durch das Hybrid 7 (A4F) ermöglichen.

Tabelle 6. Kolonie-Lift Filterassay zum Nachweis der Expression der β -Galaktosidase (vgl. Abbildung 54).

Hefe-stamm	pB42AD (leer)	nat. SH3 (6)	A4F-SH3 (7)	Pep1-Hybrid (8)	Reporter <i>lacZ</i>	Interaktion erwartet?	Resultat mit X-Gal
⊕		X		X	X	ja	blau
①			X (Kolonie 1)	X	X	nein	weiß
②			X (Kolonie 2)	X	X	nein	weiß
③			X (Kolonie 3)	X	X	nein	weiß
④			X (Kolonie 4)	X	X	nein	weiß
⑤			X (Kolonie 1)		X	nein	weiß
⑥			X (Kolonie 2)		X	nein	weiß
⊖	X				X	nein	weiß

(Von Hefen mit der Hybrid-Kombination 7 und 8 wurden 4 zufällig ausgewählte Kolonien untersucht. Im Falle von Hefezellen, die nur das Hybrid 7 exprimieren, wurde eine Doppelbestimmung durchgeführt.)

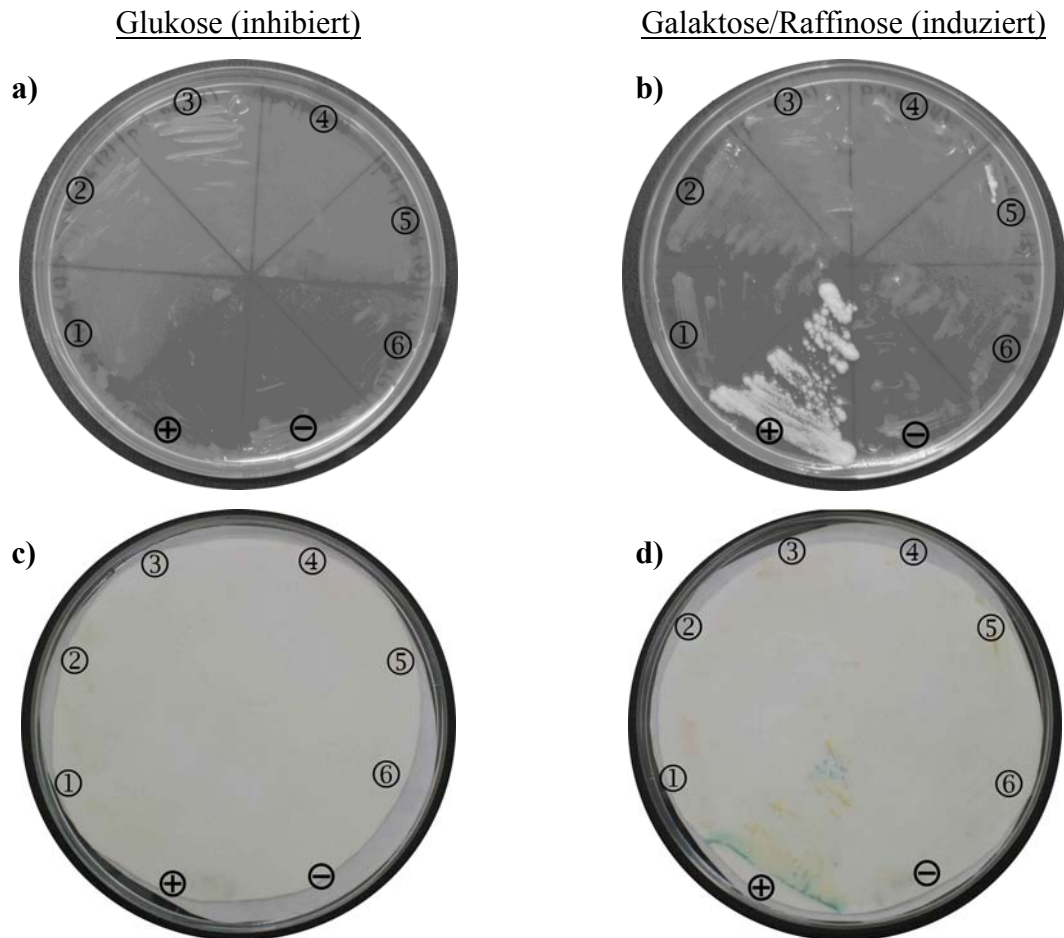


Abbildung 54. Kolonie-Lift Filterassay mit X-Gal zum Nachweis der Expression der β -Galaktosidase. Es wurden die in Tabelle 6 genannten Kombinationen getestet. Die Platten bestanden aus SD-Festmedium (-Ura/-His/-Trp/-Leu) mit Glukose (a und c: *GALI*-Promotor inhibiert) oder Galaktose/Raffinose (b und d: *GALI*-Promotor induziert). Die Bildung eines blauen Farbstoffes zeigt die Umsetzung des Substrates X-Gal durch die β -Galaktosidase, welche unter der Transkriptionskontrolle von LexA-Operatoren steht.

Neben dem Wachstum der Hefezellen ist die Bildung des blauen Farbstoffes lediglich bei der Positiv-Kontrolle bestehend aus LexA-Hybrid **6** (nat. SH3) und dem AD-Hybrid **8** (Pep1) zu beobachten (Abbildung 54, \oplus). Daher wird die Interaktion zwischen dem Hybrid der natürlichen SH3-Domäne und dem Hybrid des Pep1-Liganden erneut bestätigt. Außerdem kann in den Ansätzen $\textcircled{5}$ und $\textcircled{6}$ keine Autoaktivierung im Bezug auf das *lacZ*-Reporterplasmid verzeichnet werden. Schließlich zeigt das Experiment, dass das Hefe-2-Hybridsystem mit der A4F-Mutante unter Selektionsbedingungen nicht wachsen kann und daher auch keine blaue Farbe produziert.

5.2.4. Proteinevolution basierend auf den DNA-Bibliotheken

Im Verlauf der Proteinevolution wurden ca. 94400 Klone insgesamt untersucht, wobei ca. 71600 Kolonien aus Bibliothek 1 hervorgingen und 22800 Kolonien aus Bibliothek 2. Die maximal möglichen Aminosäure-Kombinationen von Bibliothek 1 berechnet sich aus $20^3 \cdot \binom{47}{3} = 1,3 \cdot 10^8$. Hierbei wird angenommen, dass jede der 3 Punktmutationen der Bibliothek (siehe Kapitel 5.2.1) das Potential besitzt maximal ein Kodon zu ändern, d. h. eine der 47 Aminosäuren der Sequenz in eine andere zu überführen. Im Falle von Bibliothek 2 (24 Kodons kodieren für 13 Aminosäuren) kann berechnet werden, dass es für die fünf zu mutierenden Aminosäure-Positionen $24^5 = 7,9 \cdot 10^6$ Kodon-Kombinationen gibt, die $13^5 = 3,7 \cdot 10^5$ einzigartige Aminosäure-Kombinationen repräsentieren. Daher wurden aus Bibliothek 2 16% der denkbaren Aminosäure-Kombinationen wie folgt analysiert und aus Bibliothek 1 $< 0,1\%$ der Aminosäure-Kombinationen.

Hefezellen, die mit einer der beiden Bibliotheken transformiert worden waren, konnten nicht direkt auf Selektionsplatten (SD/-Ura/-His/-Trp/-Leu/Gal/Raf) ausplattiert werden, da sich hier keine Kolonien bildeten. Dieses Problem wurde selbst bei der Positiv-Kontrolle, der natürlichen SH3-Domäne, beobachtet, weshalb die Annahme entstand, dass die Interaktion zwischen der natürlichen SH3-Domäne und dem Liganden Pep1 im Kontext des Hefe-2-Hybridsystems äußerst schwach sei. Deshalb wurden die Transformanten zuerst auf Standardmedium mit Glukose und Leucin herangezogen und anschließend die erhaltenen Kolonien auf Selektionsplatten umgestempelt (Abbildung 55).

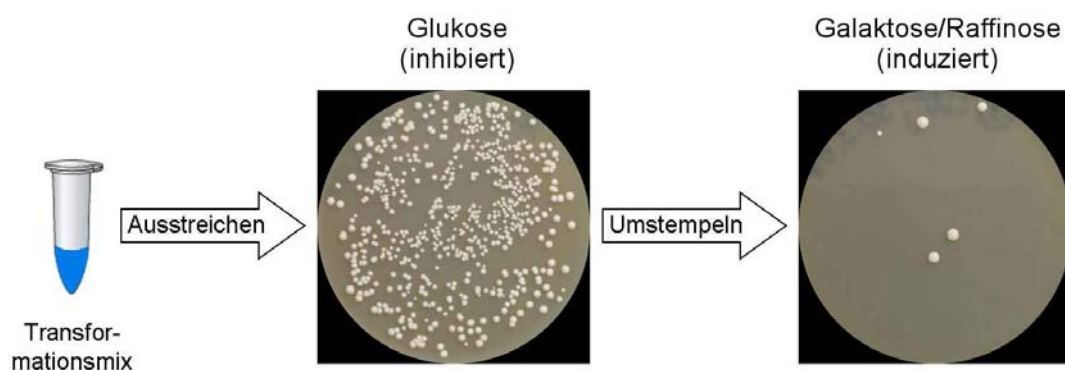


Abbildung 55. Schema der Arbeitsschritte nach der Transformation der Hefezellen.

Dabei bestand das Problem, dass keine klare Unterscheidung evtl. vorhandener, lebensfähiger Hefekolonien von abgestorbenen Zellen möglich war. Daher konnte lediglich durch Umstreichen vielversprechend aussehender „Kolonien“ auf neue Selektionsplatten ihre Überlebens-

fähigkeit getestet werden. Wurde das Wachstum bestimmter Hefezellen festgestellt, wurde über eine Vereinzelung der Plasmide mit Hilfe von KC8 *E. coli*-Zellen das Plasmid des Hybrids der LexA-Domäne präpariert. Schließlich wurden Hefezellen erneut mit dem Plasmid transformiert, um Falsch-positive Selektionen auf diesem Wege zu identifizieren. Abbildung 56 zeigt exemplarisch das Wachstum von Hefezellen, die mit einem bereits selektierten und sequenzierten Plasmid des DNA-bindenden Hybrids **7a** (A4F, Bib.) erneut transformiert wurden. Im vorliegenden Fall entstanden die Mutanten der A4F SH3-Domäne durch Einsatz der Bibliothek 1 (epPCR).

Die Hefezellen des Klons **7aL01** zeigten bereits 3 Tage nach dem Umstempeln auf Platten mit Selektionsbedingungen ein leichtes Wachstum (Abbildung 56). Der Klon **7aL02** und die Negativ-Kontrolle ließen nach 3 Tagen Inkubation auf Platten mit Galaktose noch kein Wachstum erkennen. Eine erneute Kontrolle 7 Tage nach dem Umstempeln bestätigte das Wachstum des Klons **7aL01**. Jedoch konnte auch im Falle des Klons **7aL02** und der Negativ-Kontrolle vereinzelt das Wachstum von Hefekolonien beobachtet werden. Die Ergebnisse zusammengefasst, konnte davon ausgegangen werden, dass **7aL01** mit der zusätzlichen Q39L-Mutation weiter untersucht werden müsste und dass **7aL02** die Selektion eines falsch Positiven bedeutete.

Um das Problem des Umstempeln zu umgehen, wurde eine Alternativmethode getestet, in der die Transformanten in Flüssigmedium über Nacht inkubiert und anschließend die Übernachtskulturen direkt auf Selektionsplatten ausgestrichen wurden (Abbildung 57).

Abbildung 58 zeigt, dass der Vorgang des Umstempeln durch eine Übernachtskultur in Standard-Flüssigmedium mit Leucin und Glukose ersetzt werden kann. Jedoch ist ein Wachstum der Hefezellen ausschließlich im Falle der Positiv-Kontrolle zu beobachten. Die Mutantenbibliothek lässt kein Wachstum einzelner Kolonien erkennen. Daher kann das Experiment nicht die Frage beantworten, ob diese Art der Behandlung der transformierten Hefezellen nur positive Resultate mit der natürlichen SH3-Domäne hervorbringt oder auch für verbesserte Varianten der A4F-Mutantenbibliothek ausreicht.

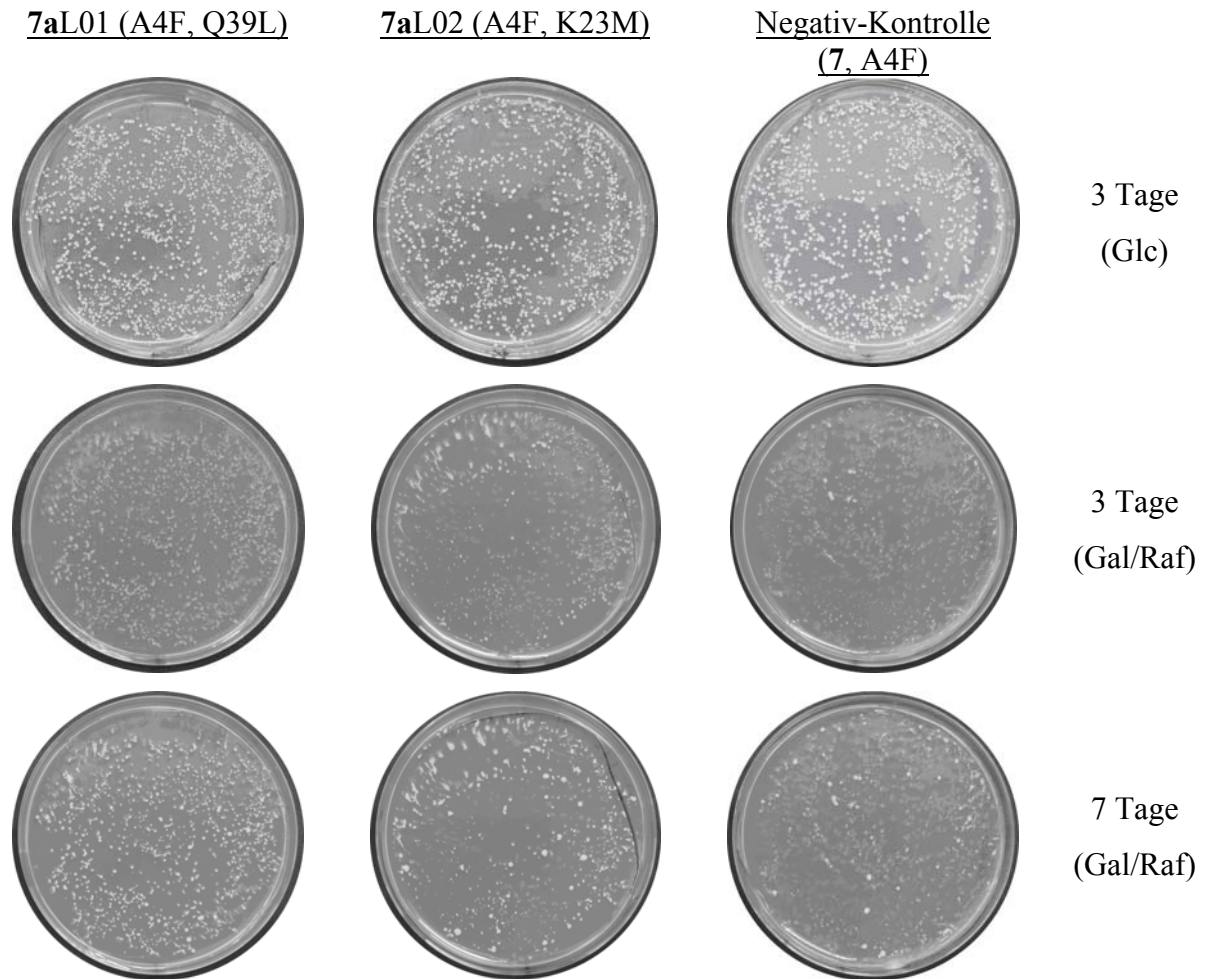


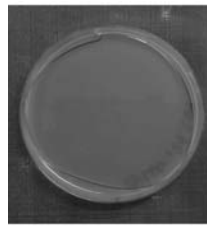
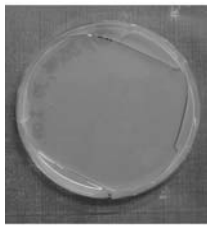
Abbildung 56. Veränderung der Zelltopologie durch Umstempeln von Medium mit Glukose (inhibiert) zu Medium mit Galaktose (induziert). Gezeigt sind exemplarisch 2 Mutanten aus Bibliothek 1 und das System mit Hybrid 7 (A4F) als Negativ-Kontrolle. Nach der Transformation wurden die Hefezellen 3 Tage auf Platten mit Glukose (Glc) herangezogen und anschließend auf Platten mit Galaktose (Gal) umgestempelt. Die unteren beiden Reihen zeigen das Wachstum der Hefekolonien 3 bzw. 7 Tage nach dem Umstempeln.



Abbildung 57. Schematische Darstellung der Arbeitsschritte zur Vermeidung des Umstempeln der Hefezellen durch Kultivierung in Flüssigmedium.

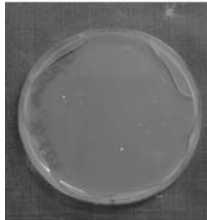
natürliche SH3-Domäne (6)

Mutanten-Bibliothek 7a



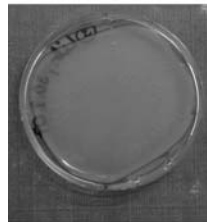
Gal/Raf-Flüssigmedium nach
Transformation

(3 Tage nach Ausstreichen)



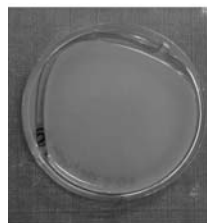
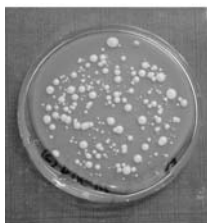
Glc-Flüssigmedium nach
Transformation

(3 Tage nach Ausstreichen)



Gal/Raf-Flüssigmedium nach
Transformation

(14 Tage nach Ausstreichen)



Glc-Flüssigmedium nach
Transformation

(14 Tage nach Ausstreichen)

Abbildung 58. Auswirkung der Inkubation der Hefezellen über Nacht nach der Transformation in Flüssigmedium mit Glc oder Gal/Raf. Dargestellt sind die Festmedium-Platten mit Selektionsmedium 3 bzw. 14 Tage nach Ausstreichen der Flüssigkultur. Neben dem System aus **6** (nat. SH3) und **8** (Pep1) (Positiv-Kontrolle) wurde auch dasjenige mit den Hybriden **7a** (A4F, Bib.) und **8** (Pep1) analysiert.

Unabhängig von der Art der Behandlung der Hefezellen, also erst Anzucht in Flüssigmedium oder Umstempeln gewachsener Kolonien, konnten auf den Selektionsplatten einige Klone gefunden werden, die auch nach erneuter Transformation des Plasmids des Hybrids der LexA-Domäne unter den Selektionsbedingungen wachsen konnten. Diese Hefeklone wurden anschließend, wie in Abbildung 59 dargestellt, mittels X-Gal auf die Bildung der β -Galaktosidase hin überprüft.

Alle in Abbildung 59 durch den Kolonie-Lift Filterassay untersuchten Hefeklone zeigten den Umsatz des Substrates X-Gal zu einem blauen Farbstoff, wodurch die Transkription des *lacZ*-Reportergens bestätigt war.

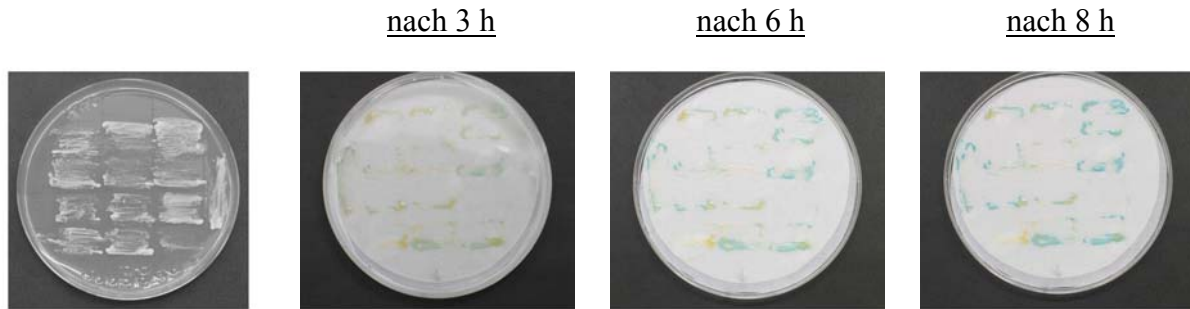


Abbildung 59. Kolonie-Lift Filterassay mit X-Gal von 13 selektierten Klonen. Neben der Ausgangs-Hefepatte ist die Bildung des blauen Farbstoffes durch die β -Galaktosidase nach 3, 6 und 8 h gezeigt. Nach 8 h ist bei allen Hefezellen eine Bildung des blauen Farbstoffes zu beobachten.

Die Klone, die während Leben/Tod-Selektionen als auch bei der Untersuchung mit dem Kolonie-Lift Filterassay ein positives Resultat zeigten, wurden sequenziert und einem ONPG-Assay (Kapitel 4.2.4 und 5.2.5) unterzogen.

5.2.5. Quantitative Bestimmung der Interaktion mittels ONPG-Assay

Der ONPG-Assay bestimmt im Gegensatz zum Kolonie-Lift Filterassay quantitativ die β -Galaktosidasekonzentration in der Hefezelle. Diese Konzentration steht in einem relativen Verhältnis zum Grad der Interaktion der beiden Hybride. Als Ergebnis wird die Aktivität der β -Galaktosidase in Miller-Einheiten erhalten [248]. Eine Miller-Einheit ist definiert als die Stoffmenge an β -Galaktosidase, die notwendig ist, um pro Minute und Zelle 1 μmol ONPG (o-Nitrophenyl- β -D-galaktopyranosid) in Galaktose und o-Nitrophenol zu hydrolysieren.

Im Rahmen des ONPG-Assays wurden neben der Positiv- (Hybrid **6** (nat. SH3) und **8** (Pep1)) und Negativ-Kontrolle (Hybrid **7** (A4F) und **8** (Pep1)) auch 48 Klone aus beiden Mutantensbibliotheken analysiert, die sich auch nach erneuter Transformation des Hybrides der DNA-bindenden Domäne durch ein gutes Zellwachstum unter Selektionsbedingungen auszeichneten. Außerdem sind zusätzlich die Klone **7aL01** und **L02** aufgeführt, da ihr Verhalten nach der zweiten Transformation exemplarisch in Abbildung 56 dargestellt ist.

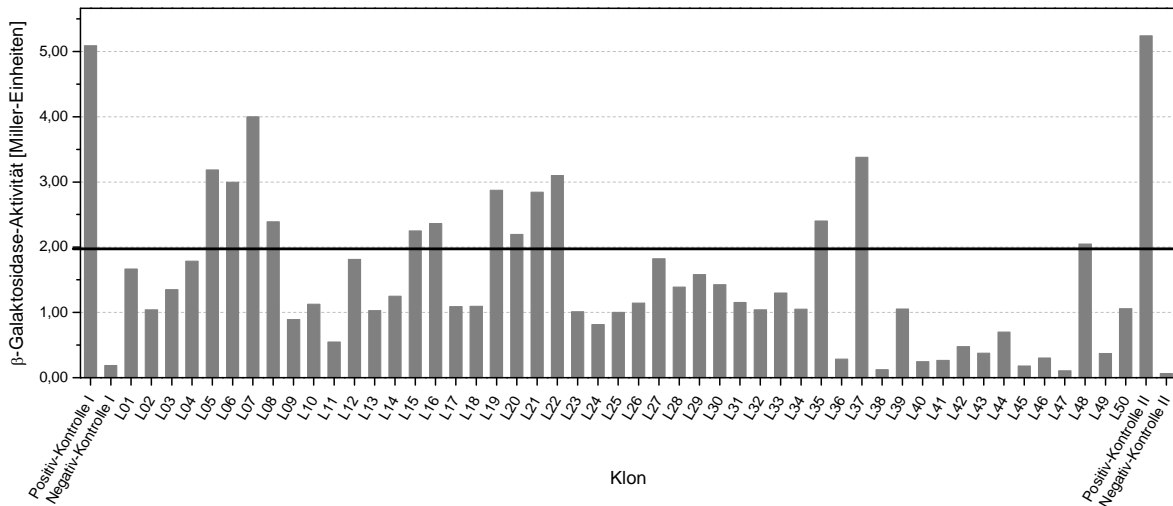
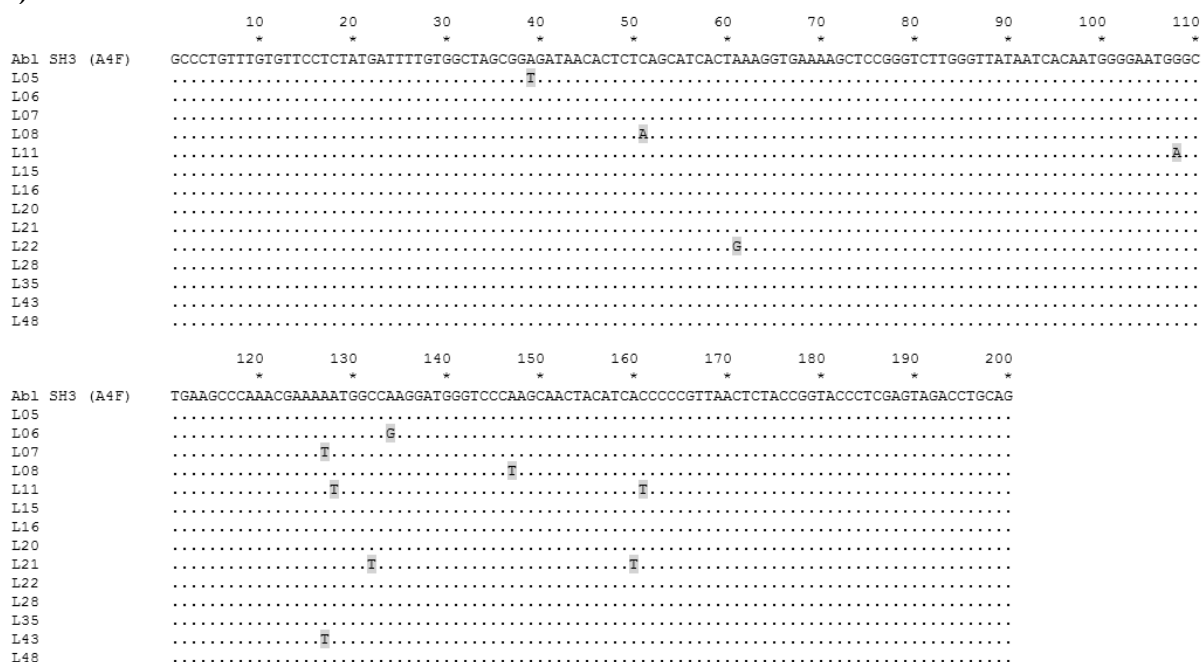


Abbildung 60. Auftragung der β -Galaktosidase-Aktivität der selektierten Klone. Die meisten Klone mit einer Aktivität von mehr als 2,0 Miller-Einheiten wurden sequenziert (Positiv-Kontrolle: System 6 (nat. SH3) und 8 (Pep1); Negativ-Kontrolle: System 7 (A4F) und 8).

Es konnten deutliche Unterschiede in der β -Galaktosidase-Aktivität der einzelnen Klone festgestellt werden (Abbildung 60). Die beiden Kontrollen lieferten in allen Experimenten Messwerte, die den Erwartungen bezüglich einer möglichen Interaktion der verwendeten Hybride entsprachen. Im Durchschnitt aller Experimente lautete der Wert für die Positiv-Kontrolle $5,17 \pm 0,08$ und für die Negativ-Kontrolle $0,12 \pm 0,06$ Miller-Einheiten. Somit lag der Messfehler bei der Positiv-Kontrolle lediglich bei ca. 1,5%, konnte aber bei sehr kleinen Werten, wie er bei der Negativ-Kontrolle auftrat, auch ca. 50% der Messung betragen. Daher waren große Unterschiede im Messwert besonders im Falle großer, experimentell bestimmter β -Galaktosidase-Konzentrationen als signifikant anzusehen. Im Hinblick auf die Klone **7aL01** (Q39L) und **L02** (K23M), fiel auf, dass die als falsch positiv gekennzeichnete Mutante **7aL02** einen zwar um 0,63 Miller-Einheiten kleineren Wert gegenüber **7aL01** aufwies (absolut **7aL01**: 1,67 und **7aL02**: 1,04). Dieser war jedoch 0,92 Miller-Einheiten größer als die Negativ-Kontrolle, was ebenfalls mit der Eigenschaft falsch positiv erklärt werden muss, da in diesen Systemen Interaktionen auftreten, die außerhalb des Zellkerns nicht möglich sind. Trotz dieser Resultate wurden neben den meisten Hefeklonen mit 2 und mehr Miller-Einheiten auch im Hinblick auf die Verteilung der Resultate des ONPG-Assays **7aL11**, **L28** und **L43** sequenziert.

a)



b)

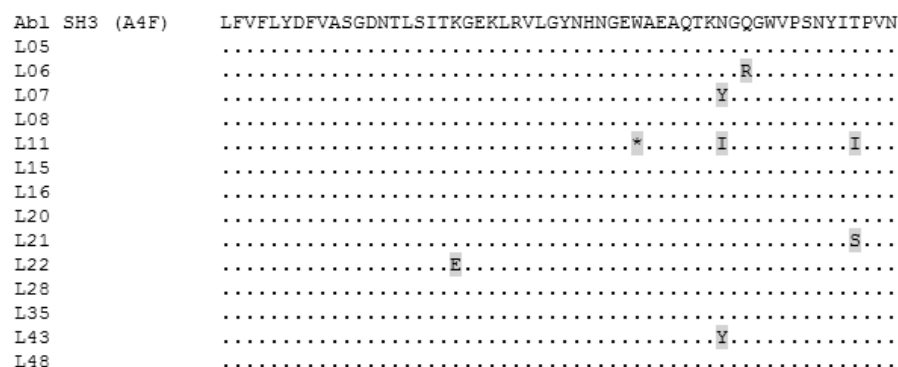


Abbildung 61. Alignment der selektierten und sequenzierten Hefemutanten. a) auf DNA-Ebene b) auf Ebene der Aminosäuren (die veränderten Basen bzw. Aminosäuren sind grau unterlegt).

Die DNA-Sequenzen der SH3-Domäne-Mutanten wurden in die zugehörigen Aminosäuresequenzen übersetzt und mit den Resultaten des ONPG-Assays verglichen (Abbildung 61). Hierbei konnten die Hefemutanten entsprechend ihrer Aminosäure-Sequenz gekoppelt mit ihrem Verhalten im ONPG-Assay in drei Gruppen eingeteilt werden. Die erste Gruppe bildeten Klone, die keine Unterschiede in ihrer Aminosäure-Sequenz zur als Negativ-Kontrolle genutzten A4F-Mutante besaßen (**7aL15**, **L16**, **L20**, **L28** und **L48**). Jedoch beträgt der Unterschied zur Negativ-Kontrolle bis zu 2,24 Miller-Einheiten und vier der genannten fünf Klone weisen Absolutwerte größer als 2 Miller-Einheiten auf. Die Mutanten der zweiten Gruppe (**7aL05** und **L08**) besitzen zwar Punktmutationen auf Ebene der DNA-Sequenz, aber diese gelten als „still“, haben also keinen Einfluss auf die Aminosäure-Sequenz. Trotzdem konnte im ONPG-Assay eine Differenz von ca. 3,07 bzw. 2,27 Miller-Einheiten zur Negativ-Kon-

trolle verzeichnet werden, die dieselbe Aminosäure-Sequenz besitzt (absolut **7aL05**: 3,19 und **L08**: 2,39). Die dritte Gruppe besteht schließlich aus Klonen (**7aL07** und **L43** (je N42Y)), die auf DNA-Ebene dieselbe Mutation besitzen, jedoch aus dem ONPG-Assay 4,00 (**7aL07**) bzw. 0,37 (**7aL43**) Miller-Einheiten resultieren. Also einmal der höchste Wert erreicht wurde und im anderen Fall nur ca. das Doppelte des Wertes der Negativ-Kontrolle auftrat.

Zusammengefasst scheint der Anteil falsch positiver Selektionen auch nach der zweiten Hefe-Transformation hoch zu sein, was nicht zuletzt auf die Probleme der Selektion nach dem Umstempeln zurückgeführt werden muss. Der hohe Anteil falsch Positiver zeigt sich besonders stark in den ersten beiden Gruppen von Klonen, von denen zu erwarten war, dass sie sich wie die Negativ-Kontrolle verhalten müssten, aber z. T. Werte gemessen wurden, die auf eine gute Interaktion der Hybride schließen ließ. Im Hinblick auf die dritte Gruppe könnte allerdings zu Gunsten des ONPG-Assays argumentiert werden, dass in Klon **7aL43** die Aktivität der exprimierten β -Galaktosidase z. B. durch Probleme während der Faltung geringer ausfiel und der gemessene Wert von **7aL07** als „richtig“ anzusehen sei.

Abschließend sei auf den Klon **7aL22** hingewiesen, da hier die positiv geladene Aminosäure Lys20 durch das negativ geladene Glu ersetzt wurde. Eine Mutation, die die Ladungsverteilung des Proteins beeinflusst und deshalb weitreichenden Einfluss auf die Struktur der Mutante der SH3-Domäne haben könnte. Im Lichte der vorstehend erläuterten Schwierigkeiten muss aber auch dieser Befund kritisch betrachtet werden.

Die während der Proteinevolution mit dem Hefe-2-Hybridsystem aufgetretenen umfangreichen Probleme führten schließlich zu dem Entschluss, keine weiterführenden Experimente, wie einen erneuten ONPG-Assay, vorzunehmen.

6. Diskussion zur Entwicklung einer schaltbaren c-Abl SH3-Domäne (Projekt 1)

6.1. Ausgangspunkt: Die natürliche c-Abl SH3-Domäne

Im Projekt 1 wurde in einem ersten Teilschritt versucht, einem, durch eine Mutation im hydrophoben Kern destabilisierten, Protein mit Hilfe der Proteinevolution (Hefe-2-Hybrid-system) eine intakte Struktur zurückzugeben. Die weiteren Teilschritte hinsichtlich der Schaltung des Proteins durch die Bindung eines Effektormoleküls in einer neu geschaffenen Kavität konnten aus den in Kapitel 6.2 und 6.3 erläuterten Gründen nicht realisiert werden.

Das Zielprotein war die der c-Abl Tyrosin-Kinase entstammende SH3-Domäne. SH3-Domänen werden nicht nur in vielen Proteinen als steuerndes Element eingesetzt, sondern sind auch ein Gegenstand vieler literaturbekannter Untersuchungen (Übersichtsartikel z. B. in [236, 264]). Dabei wurde nicht nur die Proteinfamilie der SH3-Domänen sondern auch die c-Abl SH3-Domäne im Speziellen oftmals in der Literatur erwähnt (z. B. [213, 214, 219, 220, 226, 228, 240]). Dies liegt wahrscheinlich in der Funktion der negativen Regulation der c-Abl Tyrosin-Kinase begründet, deren Inaktivierung einen entscheidenden Aspekt bei der Erkrankung an chronischer myeloischer Leukämie ausmacht. Daher wäre die gezielte Steuerung der Funktion der SH3-Domäne durch Wiederherstellung der intakten Proteinfaltung, nach vorheriger mutationsbedingter Destabilisierung, mit Hilfe eines molekularen Schalters, ein lohnenswerter Untersuchungs-Ansatz, der eine genaue temporale Funktionssteuerung der c-Abl SH3-Domäne ermögliche. Außerdem erlaubt das Projekt neue Erkenntnisse auf dem Gebiet der Generierung neuartiger, künstlicher Kavitäten in der Struktur natürlich vorkommender Proteine zu sammeln. Einem Gebiet, das bislang, aufgrund der Schwierigkeit eine intakte Proteinfaltung wieder herzustellen, recht wenig erforscht wurde [178, 180, 185].

Die rekombinant hergestellte, natürliche c-Abl SH3-Domäne (**1**) wurde bezüglich ihrer Faltung mit Circular dichroismus-Spektroskopie und Schmelzpunktsanalysen untersucht. Die Bestimmung der Bindungskonstante erfolgte durch Messung der Veränderung der Fluoreszenzemission der Tryptophane der SH3-Domäne bei Bindung von Pep1 (einem Derivat des Liganden p40 [220]). Die gewonnenen CD-Spektren entsprachen dem für die SH3-Domäne in der Literatur veröffentlichten Spektrum [261]. Dieses Ergebnis lässt zwei wichtige Rückschlüsse hinsichtlich der untersuchten SH3-Domäne (**1**) zu. Erstens konnte eine intakte Sekundärstruktur angenommen werden. Zweitens wurde eine zu ca. 75% zur Literatur homologe SH3-Domäne (**1**) benutzt, wobei der größte Unterschied in der zusätzlich C-terminal

vorhandenen Sequenz aus 19 Aminosäuren inklusive His₆-Tag zu suchen ist. Daher kann mit hoher Wahrscheinlichkeit davon ausgegangen werden, dass sich die im Rahmen dieser Arbeit exprimierte SH3-Domäne (**1**) bezüglich der Ligandbindung ähnlich zu der Literatur-bekannten Kristallstruktur zwischen Abl SH3-Domäne und Ligand p41 [221] verhält.

Die Verringerung der Elliptizitätswerte des Maximums bei 229 nm bei ansteigender Temperatur konnte als Indikator für den Strukturverlust durch thermische Denaturierung gewertet werden. Während der Denaturierung verändert sich die Umgebung der Tryptophane, wodurch ihre Auswirkungen in Form des Maximums bei 229 nm auf das CD-Spektrum beendet werden (siehe Kapitel 5.1.3.). Da keine Schmelztemperatur für eine rekombinant exprimierte Abl SH3-Domäne in der Literatur gefunden wurde, kann der Messwert der im Rahmen dieser Arbeit untersuchten natürlichen SH3-Domäne (**1**) lediglich in den Gesamtzusammenhang der SH3-Domänen eingeordnet werden. Als erster Bezugspunkt diene die Schmelzkurve einer künstlichen, durch Peptidsynthese nach dem Boc-Protokoll hergestellten, Abl SH3-Domäne [265]. Ohne Bindung des Liganden p40 erhielt man einen Schmelzpunkt von 63,3°C für die künstliche Abl SH3-Domäne, in Anwesenheit des Liganden stieg der Wert auf 70,9°C. Jedoch lag nur der Wert mit Ligandbindung in der Nähe des im Rahmen dieser Arbeit durch mehrfache, unabhängige Messreihen erhaltenen Wertes für die natürliche SH3-Domäne (**1**) von $71,50 \pm 0,57^\circ\text{C}$. Ein Vergleich mit anderen SH3-Domänen hilft die experimentell ermittelte Schmelztemperatur besser einzuordnen. So lautet die Schmelztemperatur für die Btk SH3 80°C, für die Fyn SH3 80°C, für die Tec SH3 71°C und für die Itk SH3 69°C [232, 266]. Die Tatsache dass sich zwei SH3-Domänen in der nächsten Umgebung der für die natürliche Abl SH3 (**1**) ermittelten Temperatur von 71,5°C befinden, bestätigt das experimentell erhaltene Ergebnis. Die Schmelztemperaturanalyse in Kombination mit den CD-Spektren erlaubt den Schluss, dass die Proteinfaltung des hydrophoben Kerns der natürlichen Faltung der SH3-Domänen entspricht.

Nachdem die richtige Proteinfaltung der natürlichen c-Abl SH3-Domäne (**1**) nachgewiesen war, konnte die Dissoziationskonstante mit dem Ligand Pep1, einem Derivat des Liganden p40 [220], ermittelt werden. Hierzu wurde die Blauverschiebung des Fluoreszenzemissionsmaximums der Tryptophane der SH3-Domäne in Abhängigkeit der Ligandenkonzentration detektiert und daraus der K_d -Wert berechnet. Der experimentell für die natürliche SH3-Domäne (**1**) bestimmte Wert der Dissoziationskonstanten lautete 103 ± 35 nM. Dieser Wert liegt in derselben Größenordnung wie der mit dem p40-Liganden gemessene (400 ± 100 nM) [220]. Jedoch unterscheidet er sich deutlich vom K_d -Wert der oben erwähnten künstlichen Abl SH3-Domäne, der zu 24,1 μM bestimmt wurde [265]. Ein ähnlicher Wert (25 ± 8 μM) wurde

mit derselben künstlichen SH3-Domäne aber mit dem massenspektrometrischen Messverfahren Suprex gefunden [267]. Daher unterliegt die künstliche SH3-Domäne während der Renaturierung der Peptidkette wahrscheinlich intrinsischen Fehlfaltungen. Zu dieser Vermutung trägt auch die vorstehend genannte Schmelztemperatur bei, die 8°C niedriger ausfällt als der experimentell für die natürliche SH3-Domäne (1) bestimmte Wert. Allerdings wurde bereits 1995 in der Literatur darauf hingewiesen, dass die Komplexität und Art der Ligandbindung, die Messtechniken und Unterschiede in der Durchführung der Experimente, sehr stark voneinander abweichende Ergebnisse zur Folge haben können [268].

6.2. Mutanten des hydrophoben Kerns der Fyn und der c-Abl SH3

In der Literatur wurde 2003 eine ausführliche Untersuchung hinsichtlich der Stabilität des hydrophoben Kernes verschiedener SH3-Domänen und im besonderen durch Mutationsstudien mit der Fyn SH3-Domäne veröffentlicht [232]. Abbildung 62 stellt einen 3D-Vergleich der Kristallstrukturen der Fyn SH3 (1shf:A, [269]) und der Abl SH3 (1abq, [218]) mit dem Algorithmus Vorometric [270] dar. Aufgrund dieses Vergleiches sollen Aussagen bezüglich der Übertragbarkeit der Ergebnisse der Fyn SH3- auf die Abl SH3-Domäne getroffen werden. Es wurde eine Aminosäuresequenz-Identität von 44,6% festgestellt. Der Abstand zwischen dem Proteinerückgrat beider SH3-Domänen für 29 der 56 miteinander verglichenen Aminosäuren beträgt weniger als 1 Å und für 23 der übrig gebliebenen 27 Aminosäuren weniger als 3 Å. Daraus lassen sich vier zueinander strukturell äquivalente Bereiche ableiten: Leu1-His31, Gly33-Thr40, Lys41 und Asn42 sowie Gly43-Pro54 (Nomenklatur gemäß Aminosäuresequenz der Abl SH3-Domäne). Aufgrund der hohen strukturellen Homologie der beiden SH3-Domänen, die aus Abbildung 62 abgeleitet werden kann, sind die Erkenntnisse der Fyn SH3 vermutlich auf die Abl SH3-Domäne übertragbar.

Ein Vergleich der Sequenzen von 266 SH3-Domänen zeigte, dass unter den am höchsten konservierten 15 Aminosäuren 9 Positionen mit Aminosäuren besetzt waren, die den hydrophoben Kern bilden [230]. Wobei die Aminosäuren an Position 16 und 4 einen besonders hohen Konservierungsgrad besaßen. So werden Leu16 und Ala4 in ca. 75% aller Sequenzen gefunden. Daraus kann abgeleitet werden, dass gerade jene Aminosäuren die Kompaktheit und

a)

	1	10	20	30	40	50	56
1abq	LFVALYDFVASGDNTLSI TKGEKLRVLGYNHNGEWCEAQT-KN-GQGWVPSNYI TPVN						
	:: : : : :: : :: :: : :: : :: : : :						
1shf: A	LFVALYDYEARTEDDL SFHKGEKFQI LNSSE-GDWWEARSLTTGETGYI PSNYVAP-V						

b)

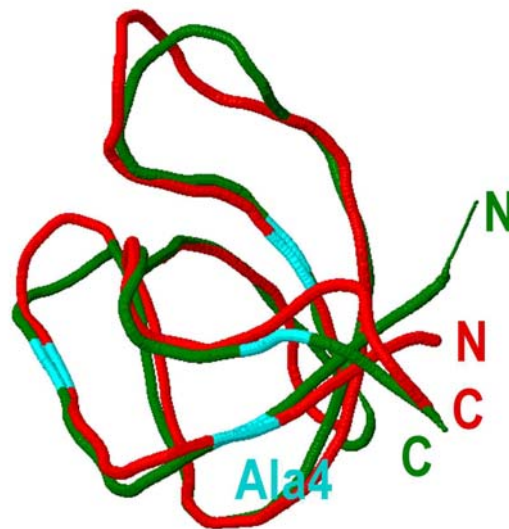


Abbildung 62. Vergleich der Position des Protein-Rückgrats der c-Abl SH3- und der Fyn SH3-Domäne mit dem Algorithmus „Vorometric“ [270]. a) Sequenzen beider SH3-Domänen (mit „|“ verbundene Aminosäuren weichen in ihrer Position um weniger als 1 Å voneinander ab; „:“ symbolisiert eine Abweichung um weniger als 3 Å; alle übrigen Aminosäuren weichen entweder um mehr als 3 Å voneinander ab oder besitzen keine vergleichbaren Partner). b) Abbildung der überlagerten Kristallstrukturen (Abl SH3: 1abq [218], rot; Fyn SH3: 1shf [269], grün; Ala in cyan markiert).

Stabilität des hydrophoben Kerns, der für die Aktivität der SH3-Domänen von entscheidender Bedeutung ist, prägen. Daher zeigen die Mutanten des Ala4 bei der Fyn SH3 eine deutlich niedrigere Schmelztemperatur als die natürliche Fyn SH3-Domäne (80,1°C). Es wurden sowohl Mutationen zu kleinen Aminosäuren wie A4S (67,5°C) und A4G (61,5°C) als auch zu sterisch anspruchsvollen wie A4V (38,6°C), A4L (50,8°C) oder A4F (39,4°C) getestet [232]. Außerdem war die Seitenkette der Aminosäure an Position 4 genau wie diejenigen der Aminosäuren an Position 47 und 52 bei einem Vergleich aller bekannten Kristallstrukturen zu keinem Zeitpunkt für das Lösungsmittel zugänglich. Da Ala4 also vollständig in den hydrophoben Kern eingebettet ist, ist der negative Effekt von Mutationen zu großen Aminosäuren leicht erklärbar. Jedoch muss es Unterschiede im Aufbau der hydrophoben Kerne der Fyn SH3 und der Abl SH3-Domäne geben, da die im Rahmen dieser Arbeit erhaltenen Ergebnisse der Fluoreszenzspektrometrie, der CD-Spektroskopie und der Schmelzkurven gezeigt haben, dass Val an Position 4 die Proteinstruktur der Abl SH3-Domäne (4) wahrscheinlich nur sehr geringfügig verändert. Der hydrophobe Kern der Abl SH3-Domäne (4) scheint somit jene

Mutation zu einer sterisch anspruchsvollen Aminosäure kompensieren zu können. Schließlich liegt der K_d -Wert der A4V-Mutante (**4**) mit 112 ± 49 nM im Bereich des Wertes für die natürliche Abl SH3-Domäne (**1**) mit Pep1 (103 ± 35 nM). Lediglich das CD-Spektrum im Bereich von 200 bis 225 nm (siehe Abbildung 44) und die um ca. 5°C niedrigere Schmelztemperatur weisen darauf hin, dass die Struktur von SH3-Domäne **4** (A4V) ungeordneter und weniger kompakt sein muss als diejenige von **1** (nat. SH3).

Im Fall der Mutation von Ala4 zu Trp oder Phe wird der bei der Fyn SH3 beobachtbare Trend auch für die Abl SH3 bestätigt. Die Folge der strukturellen Destabilisierung der SH3-Domäne scheint ein in der Zelle stattfindender proteolytischer Abbau zu sein, wie die Ergebnisse des Western Blots nahelegen. Um den notwendigen Raum für die Seitenketten im hydrophoben Kern bereitzustellen, sind drei Lösungsansätze denkbar.

Erstens ermittelt man in einem rationellen Ansatz anhand der Kristallstruktur räumlich benachbarte Aminosäuren, um diese gezielt zu verändern. Hierbei ist aus einem Vergleich der Kristallstrukturen von 17 SH3-Domänen ersichtlich, dass die Aminosäure an Position 4 in 16 Kristallstrukturen Kontakte zu Position 18 und 52 (Abl SH3) bzw. 53 (Fyn SH3) sowie selten zu Position 24 besitzt [232]. Daher wurden Doppel- (A4V/F18L bzw. A4V/F24V) und eine Trippelmutante (A4V/F18L/F24V) von A4V Fyn SH3 hergestellt. Die Einführung der zusätzlichen Mutation F24V hob die Schmelztemperatur um 36,1°C an. Die Trippelmutante A4V/F18L/F24V verringerte zwar den Schmelztemperaturgewinn auf 31,0°C, allerdings konnte hier ein deutlich besserer K_d -Wert von 3,6 μ M, der mit der A4V Fyn-Mutante nicht bestimmbar gewesen war, erhalten werden. Die im Rahmen dieser Arbeit selbst hergestellte Doppelmutante A4W/I18A der Abl SH3-Domäne zeigte jedoch keine Stabilisierung des hydrophoben Kerns. Dies kann auf zwei Tatsachen beruhen, entweder war der in der Doppelmutante herbeigeführte Raumgewinn nicht ausreichend oder mit Ile18 wurde eine Aminosäure zur Mutagenese gewählt, die für den Aufbau des hydrophoben Kerns essentiell ist. Dieselbe Mutation (F18A) liefert bei der Fyn SH3 eine Abnahme der T_M von 22,3°C im Vergleich zur natürlichen Fyn SH3-Domäne [232]. Dies zeigt die wichtige Rolle von Phe18 in der Fyn SH3-Domäne.

Der zweite Lösungsweg zur Suche nach einer kompensierenden Mutation nutzt einen semi-rationalen Ansatz, wie er in Bibliothek 2 verwirklicht wurde. Hierbei wurden an gezielt ausgewählten Aminosäurepositionen (Leu16, Ile18, Leu24, Val47 und Ile52) neue Kodons durch degenerierte Primer eingeführt. Alle genutzten Positionen gehören zu Aminosäuren die zu den 15 am stärksten konservierten zählen (Abbildung 63) [230]. Allerdings weichen die in der natürlichen Abl SH3 dort positionierten Aminosäuren häufig von denjenigen, die in der

Mehrzahl der SH3-Domänen gefunden werden, ab. So überwiegt an Position 18 Phe statt Ile, an Position 24 Ile statt Leu, an Position 47 Phe statt Val und an Position 52 Val statt Ile. Lediglich das Leu16 ist in mehr als 75% aller Sequenzen konserviert. Daher kann angenommen werden, dass kompensierende Mutationen der Abl SH3-Domäne von den Aminosäuren abweichen müssen, die in der Mehrzahl der SH3-Domänen dort natürlich vorkommen.

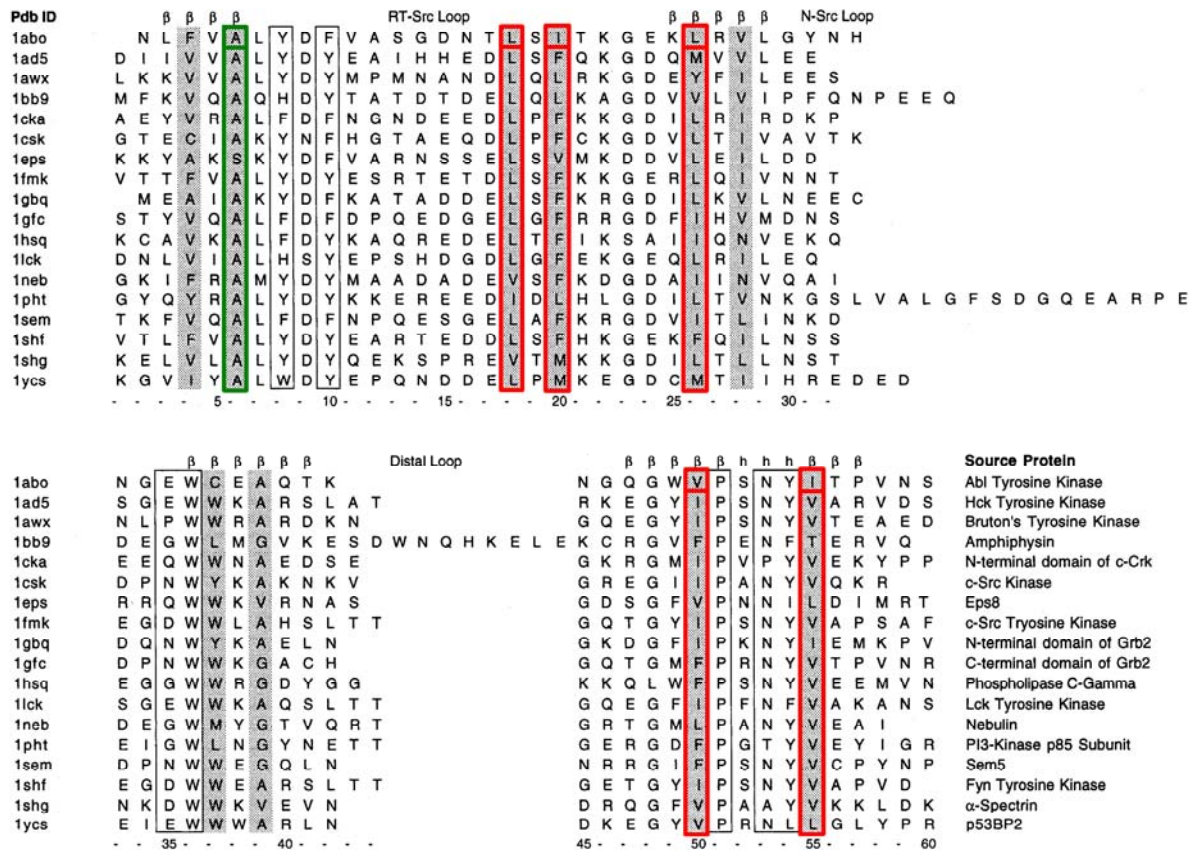


Abbildung 63. Alignment von SH3-Domänen. Aus einem Alignment von 266 SH3-Domänen sind die Sequenzen von 18 SH3-Domänen gezeigt, deren Kristallstruktur bekannt ist. Bezüglich der Schleifenregionen N-Src und Distal ist das dargestellte Alignment repräsentativ für alle 266 untersuchten SH3-Domänen. Hochkonservierte Aminosäuren des hydrophoben Kerns sind grau unterlegt und konservierte Aminosäuren für die Ligandbindung schwarz umrandet. Die Position von Ala4 ist grün angedeutet und die fünf, mutierten Aminosäuren der Bibliothek 2 sind durch einen roten Rand hervorgehoben. (nach [230])

Der dritte Ansatz, um Trp oder Phe an Position 4 im hydrophoben Kern zu etablieren, nutzt die Überlegung, dass auch Mutationen, die in keiner Beziehung zum hydrophoben Kern stehen, die Proteingesamtstruktur maßgeblich beeinflussen können. Aus diesen Überlegungen ging die mittels epPCR hergestellte Bibliothek 1 hervor. Wobei die Schwierigkeit in der Tatsache bestand, auf einem Sequenzabschnitt von 153 bp möglichst viele Mutationen zu erreichen. Zwar wurde mit 17 Mutationen pro 1 kb eine vergleichsweise hohe Mutationsrate erreicht, d. h. ca. 3 Mutationen im betrachteten DNA-Abschnitt, jedoch ist die Verteilung auf die einzelnen Klone sehr ungleichmäßig (Abbildung 47).

6.3. Das Hefe-2-Hybridsystem zur Selektion stabiler SH3-Domänen

Im Falle von Bibliothek 2 (24 Kodons kodieren für 13 Aminosäuren) kann leicht berechnet werden, dass es für die fünf zu mutierenden Aminosäure-Positionen $13^5 = 3,7 \cdot 10^5$ einzigartige Aminosäure-Kombinationen gibt. Für Bibliothek 1 ist die theoretische Zahl größer und berechnet sich zu $1,3 \cdot 10^8$ Aminosäure-Kombinationen (Rechnung siehe Kapitel 5.2.4). Da nach jeder Transformation sich im Durchschnitt 400 Kolonien auf den ausgestrichenen Platten befanden, wurden im Laufe des Projektes ca. 94400 Klone insgesamt untersucht. Sie verteilten sich auf die einzelnen Bibliotheken jedoch wie folgt: Unter Einsatz von Bibliothek 1 wurden ca. 71600 Kolonien durchgemustert und die später hergestellte Bibliothek 2 fand Einsatz in 22800 Untersuchungen. Dies stellte lediglich 16% der denkbaren Aminosäure-Kombinationen aus Bibliothek 2 sowie $< 0,1\%$ der Aminosäure-Kombinationen der Bibliothek 1 dar. Zu der geringen Anzahl an untersuchten Kolonien im Hinblick auf Bibliothek 1 und 2 kamen noch zwei Schwierigkeiten hinzu, die während der Experimente auftraten. Erstens war es nicht möglich die transformierten Hefezellen direkt auf dem Selektionsmedium (Standardmedium ohne Ura, His, Trp und Leu aber mit Gal/Raf) auszustreichen, sondern sie mussten erst auf Standardmedium mit Glc als Kohlenstoffquelle, die den *GAL*-Promotor inhibiert, herangezogen werden. Nach ca. drei Tagen wurden sie auf Platten mit Selektionsbedingungen umgestempelt. Dabei erwies es sich nach weiteren drei Tagen Inkubation als äußerst schwierig, erneut herangewachsene Kolonien von abgestorbenen Zellhaufen zu unterscheiden. Außerdem zeigt Abbildung 56, dass einige Hefezellen auf vorhergehenden Kolonien wachsen. Für jene Hefezellen wurde in Experimenten ein als *cross feeding* bezeichnetes Verhalten gezeigt [271], so dass ca. 45% trotz des Verlustes von Auxotrophien auf dem entsprechenden Medium wachsen können, da sie von den Zellen, auf denen sie gewachsen sind, leben können. Ein möglicher Lösungsversuch um das Problem des Umstempelns zu umgehen, lag in der Inkubation der Transformanten über Nacht in Flüssigmedium. Allerdings ermöglichte nur die Inkubation in Medium mit Glukose (keine Selektionsbedingungen) ein anschließendes Überleben der Zellen mit der Positiv-Kontrolle **6** (nat. SH3) und dem Hybrid der Aktivatorodomäne **8** auf Platten mit Selektionsbedingungen, wie Abbildung 58 dokumentiert.

Zweitens zeigten die Sequenzierungen einiger Klone (Abbildung 61), deren β -Glaktosidase-Aktivität nach ONPG-Assay (Abbildung 60) als hoch bewertet wurde, unerwartete Ergebnisse. So wurden Klone sequenziert, die keine Abweichungen zur Sequenz der Negativ-Kontrolle besaßen, aber die β -Galaktosidase-Aktivität um bis zu 2,24 Miller-Einheiten zu größeren Werten hin abwich. Andere Klone wiesen lediglich auf DNA-Ebene eine stille Mu-

tation auf, also bestand kein Unterschied zwischen ihrer Aminosäuresequenz und derjenigen der Negativ-Kontrolle. Trotzdem resultierten aus dem ONPG-Assay Werte, die um bis zu 3 Miller-Einheiten höher lagen als bei der Negativ-Kontrolle (0,12 Miller-Einheiten). Schließlich traten auch Klone auf, die nach Sequenzierung dieselbe Aminosäurefolge besaßen, aber im ONPG-Experiment um 3,62 Miller-Einheiten voneinander abwichen. Für dieses Ergebnis könnte die Erklärung eine unterschiedlich aktive β -Glaktosidase lauten, da viele Zelleinflüsse sich auf *in vivo*-Experimente auswirken können. Im Falle der übrigen Klone, deren Aminosäuresequenzen von derjenigen der Negativ-Kontrolle nicht unterscheidbar waren, wären als Erklärung ausschließlich falsch positiv selektierte Hefen denkbar. Hierbei können die falsch positiven Selektionen in zwei Gruppen unterteilt werden, nämlich die technisch- und die biologisch falsch Positiven [272]. Die erste Gruppe besteht aus den falsch positiven Selektionen von Autoaktivierungsvorgängen, hiergegen sprechen allerdings die in Abbildung 53 gezeigten Ergebnisse. Allerdings wirken sich sehr schwache Autoaktivierungsvorgänge vermutlich erst bei der Durchführung von zeitlich lange andauernden Experimenten aus. Die biologisch falsch Positiven bezeichnen Protein/Protein-Interaktionen, die aufgrund der hohen Konzentration der Hybride im Zellkern entstehen, aber im zellulären Milieu normalerweise nicht auftreten würden. Eine Selektion von biologisch falsch Positiven während der Experimente muss als wahrscheinlich angesehen werden und kann sehr schlecht kontrolliert werden. Abschließend sei gesagt, dass die Literatur [124] davon ausgeht, dass 50% aller selektierten Klone falsch positiv sein können.

Im Hinblick auf das gesamte Projekt, konnte die Struktur des hydrophoben Kerns der c-Abl SH3-Domäne durch eine Mutation des Ala4 zu Trp oder Phe zwar destabilisiert werden, jedoch konnte keine kompensierende Mutation durch die Proteinevolution mit Hilfe des Hefe-2-Hybridsystems isoliert werden. Daher wurde das Projekt 1 an jenem Punkt abgebrochen.

Außerdem sei noch erwähnt, dass die Verwendung der LexA-Bindedomäne zwar verglichen mit der GAL4-Bindedomäne die Detektion schwacher Interaktionen ermöglicht, aber die Dissoziationskonstante der natürlichen Abl SH3-Domäne (**1**) und Pep**1** liegt im Grenzbereich des verwendeten Matchmaker LexA Hefe-2-Hybridsystems [273].

6.4. Ausblick für Projekt 1

Die wichtigste Voraussetzung für die Fortführung des Projektes wäre, die Anzahl der falsch Positiven drastisch zu verringern. Hierzu könnten drei verschiedene Lösungsansätze genutzt

werden. Die Möglichkeit mit dem geringsten Arbeitsaufwand wäre vermutlich ein Austausch der Hybride, so dass das Pep1 mit der LexA-Domäne fusioniert sei und die Aktivator-domäne als Fusionspartner die SH3-Domäne besäße. Nun hänge die Autoaktivierung lediglich von Pep1 ab und nicht von einer großen Anzahl unterschiedlich gefalteter Mutanten von Protein 7 (A4F).

Zusammen mit dem vorstehend genannten Lösungsweg oder auch alleine könnte die Paarung haploider Hefezellen des Typs α mit denjenigen des Typs a zu einer diploiden Zelle ausgenutzt werden. Dabei befände sich z. B. das Hybrid der DNA-Bindedomäne ausschließlich in Zellen des Typs a und umgekehrt das Hybrid der Aktivator-domäne nur in Zellen des Typs α . Die räumliche Trennung der beiden Plasmide kann somit ausschließlich durch die Paarung der beiden Zellen aufgehoben werden. Sind Zellen des Typs a unter Selektionsbedingungen selbstständig überlebensfähig, muss mit großer Sicherheit von Autoaktivierung der Transkription des Reportergens ausgegangen werden. Gleiches gilt für die Zellen des Typs α , die ausschließlich das Hybrid der Aktivator-domäne beinhalten. Außerdem wird die iterative Transformation der Hefezellen zuerst mit dem Plasmid der Aktivator-domäne und anschließend demjenigen der DNA-bindenden Domäne zu Gunsten einer parallel durchführbaren Transformation vereinfacht.

Der dritte Lösungsansatz stellt die Übertragung der Hybride in ein Hefe-2-Hybridsystem der neueren Generation dar. So besitzt das neueste Matchmaker Hefe-2-Hybridsystem von *Clontech* mehrere Mechanismen um die Selektion falsch positiver Hefeklonen auf ein Minimum zu reduzieren [274]. Erstens kann auf die Reporter *HIS3* (Histidin-Biosynthese) und *ADE2* (Adenin-Biosynthese) selektiert werden, wobei die Histidin-Biosynthese noch zusätzlich durch die Verwendung von 3-Amino-1,2,4-Triazol inhibiert werden kann [275-277]. Zweitens sind alle vier Reportergene ins Hefegenom integriert und befinden sich unter der Kontrolle von drei unterschiedlichen Promotoren, weshalb die Aktivierung eines Promotors allein z. B. durch in der Zelle natürlich vorkommende Proteine oder durch Autoaktivierung von einem Hybridprotein keine Aushebelung der gesamten Selektion bedeutet. Drittens wird das für Hefen toxische Antibiotikum Aureobasidin A verwendet gegen das das *AURI-C*-Gen eine Resistenz vermittelt, wodurch es zu einer stärkeren Reduktion des Hintergrunds kommt, als es bei Auxotrophiemarkern üblich ist [274]. Weiterhin wird die Transformation der Hefezellen durch die Paarung haploider Zellen ersetzt und somit das Experiment vereinfacht und beschleunigt. Darüber hinaus ist durch das Reportergen *MEL1*, das für die α -Galaktosidase kodiert, auch ein farbiger Assay möglich.

Im Hinblick auf die zu verwendende Bibliothek erscheint es ratsam, die Bibliothek 2 vollständig zu durchmustern. Dabei wäre die Nutzung der Anzucht der Transformanden in Flüssigmedium über Nacht dem Vorgang des Umstempelns vorzuziehen. Jedoch müsste vorher noch ausgiebig untersucht werden, ob die Glukose-Aufnahme während der Übernacht-Inkubation keine lang anhaltende Inhibierung des *GAL*-Promotors bewirkt, der schließlich für die Transkription des *LEU2* essentiell ist, damit die Hefezellen auf den Platten mit Selektionsbedingungen wachsen können. Außerdem muss in zukünftigen Experimenten verstärkt auf das *cross feeding*-Problem geachtet werden, so dass sich während der Selektion alle im Rahmen des Hefe-2-Hybridsystems genutzten Plasmide in der Zelle befinden.

Trotz der Tatsache, dass Mutationen im hydrophoben Kern der strukturell sehr ähnlichen Fyn SH3-Domäne ausgeglichen werden konnten [232], muss die Möglichkeit in Betracht gezogen werden, dass die Abl SH3-Domäne zu rigide ist, um den hohen destabilisierenden Effekt der Mutation kompensieren zu können.

Projekt 2:

Entwicklung einer Variante des Phagen-Display zur Verbesserung
der *trans*-Proteinspleißaktivität des künstlich gespaltenen
DnaB-Inteins aus *Synechocystis* sp. PCC6803

7. Einleitung zum *trans*-Proteinspleißen an der Bakteriophagen-Hülle

7.1. Inteine: Struktur und Funktion

Ein zum RNA-Spleißen analoger Prozess auf post-translationaler Ebene ist das Intein-vermittelte Proteinspleißen [278]. Bei diesem autokatalytischen Vorgang wird ein Intein (*internal protein*) aus einem Vorläuferprotein herausgetrennt, wobei die N- und C-terminal flankierenden Peptid- oder Proteinsequenzen (Exteine, *external protein*) über eine native Peptidbindung miteinander verknüpft werden. Daher entstehen durch den Prozess des Proteinspleißens zwei Produkte: Das herausgeschnittene Intein und die als Spleißprodukt bezeichneten verknüpften Exteine. Bemerkenswerterweise verläuft die Reaktion ohne Zufuhr externer Energie, die Beteiligung zusätzlicher Enzyme und Kofaktoren ab. Die gesamte für das Proteinspleißen benötigte Energie wird alleinig durch die Struktur des Inteins zur Verfügung gestellt.

In der Natur bevorzugen Inteine Positionen in essentiellen Proteinen, die an der DNA-Reparatur oder -Replikation beteiligt sind. Hier sind sie meist in hochkonservierten Bereichen oder in den aktiven Zentren der Wirtsproteine angesiedelt [279]. Mittlerweile wurden mehr als 350 Inteine sowohl aus Archaea, Bakterien oder Eukaryoten (größtenteils lediglich durch Sequenzhomologiestudien) [280] identifiziert, die in drei Familien untergliedert werden. Sie werden, bezogen auf ihre Struktur, in Maxi-, Mini- und gespaltene Inteine unterteilt.

Bei Maxiinteinen ist die Hint-Domäne (**H**edgehog-**I**ntein-Domäne) durch eine Homing Endonuklease in zwei Subdomänen aufgeteilt (Abbildung 64). Man bezeichnet die Subdomänen entsprechend ihrer Position in der Proteinsequenz als N- und C-terminale Spleißdomäne. Jede der beiden Domänen weist hochkonservierte Aminosäuresequenzmotive auf (Tabelle 7) [280-283]. In der N-terminalen Spleißdomäne befinden sich die Motive A, N2, B und N4. Das Motiv F ist in der C-terminalen Spleißdomäne lokalisiert. Motiv G umfasst zusätzlich die erste Aminosäure des C-terminalen Exteins. In Maxiinteinen treten darüber hinaus in der Homing Endonuklease-Domäne die konservierten Aminosäuresequenzmotive C, D, E und H auf.

Maxiinteine gliedern sich in drei Domänen und sind in der Regel aus 450-600 Aminosäuren aufgebaut [284]. Es existieren allerdings auch Inteine, die aus bis zu 1650 Aminosäuren bestehen [285]. Die Homing Endonuklease erlaubt den Maxiinteinen eine Weiterverbreitung in

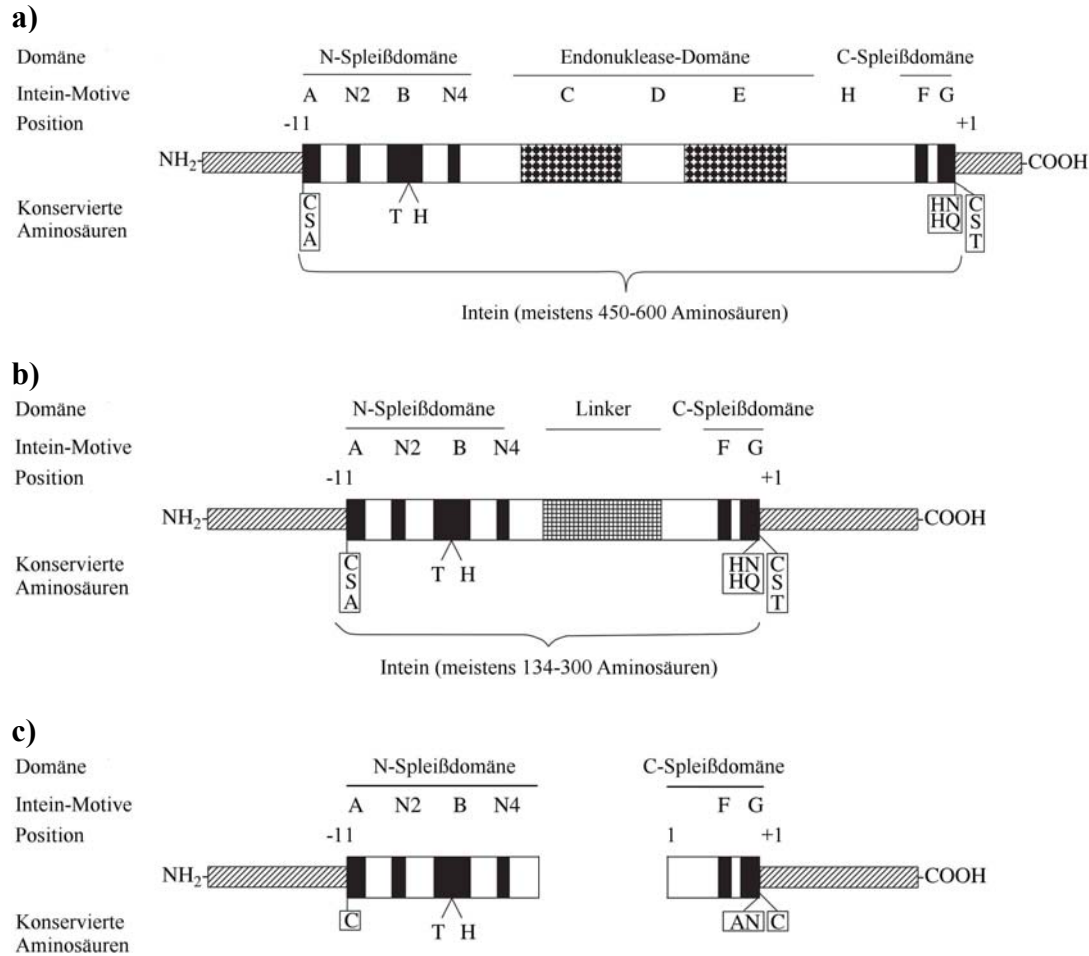


Abbildung 64. Schematische Darstellung der Intein-Struktur. Gezeigt ist die Lage der Struktur motive (A, N2, B, N4, C, D, E, H, F, und G) sowie der wichtigsten, konservierten Aminosäuren. a) Maxiintein mit Endonuklease-Domäne. b) Miniintein mit kurzer Aminosäuresequenz (Linker), die die beiden Spleißdomänen verbindet. c) *Ssp* DnaE-Intein als Beispiel für ein natürlich gespaltenes Intein. (nach [286])

Tabelle 7. Konservierten Intein-Struktur motive und ihr Aufbau.

Domäne	Strukturmotiv	Aminosäuresequenz
N-terminale Spleißdomäne	A	Ch..Dp.hhh..G
	N2	...GD..
	B	G..h.hT..H.hhh
	N4GD.....
Endonuklease-Domäne	C	LhG..hnhG
	D	.K.IP..h
	E	.L.GhFnhdG
	H	p.S..hh..h..LL..hGI
C-terminale Spleißdomäne	F	aVYDLpV..n..HNFh
	G	NGhhhHN p ⁺

(h: hydrophobe Aminosäure (G, V, L, I, A, M); n: negativ geladen (D, E); p: polare Aminosäure (S, T, C); a: aromatische Aminosäure (F, Y, W); .: nicht konserviert; |p⁺: C-terminale Spaltstelle mit Aminosäure +1 des C-Exteins (S, T, C))

Allele, die bislang keine Inteine aufweisen, und ermöglicht dadurch die Erschließung neuer Wirtsproteine [287, 288].

Es wird angenommen, dass die Miniinteine im Laufe der Evolution aus den Maxiinteinen hervorgegangen sind, da nur wenige natürlich vorkommende Miniinteine bekannt sind und sie statt der Homing Endonuklease-Domäne eine kurze Peptidsequenz besitzen. Miniinteine bestehen in der Regel aus 134 bis 300 Aminosäuren und haben durch den Verlust der Homing Endonuklease keine Möglichkeit sich in andere Organismen zu verbreiten.

In der dritten Gruppe, den gespaltenen Inteinen ist die Verbindung zwischen der N- und C-terminalen Spleißdomäne vollständig verlorengegangen. Die resultierenden Fragmente, bestehend aus N-Extein und N-Intein (Int^{N}) sowie C-Intein (Int^{C}) und C-Extein, sind auf voneinander unabhängigen DNA-Abschnitten kodiert. So beträgt der Abstand der beiden Gene z. B. beim DnaE-Intein des Cyanobakteriums *Synechocystis* sp. PCC6803 750 kbp. Die am besten untersuchten natürlich vorkommenden gespaltenen Inteine sind die DnaE-Inteine einiger Cyanobakterien (z. B. *Synechocystis* sp. PCC6803 DnaE (*Ssp* DnaE), *Nostoc punctiforme* PCC73102 DnaE (*Npu* DnaE), *Nostoc* sp. PCC7120 DnaE (*Nsp* DnaE), *Thermosynechococcus vulcanus* (*Tvu* DnaE)) [289-292] und das aus der DNA-Polymerase des Thermophilen *Nanoarchaeum equitans* stammende *Neq* Pol Intein [293].

In Untersuchungen des *Psp* GBD Pol Inteins aus der hitzestabilen DNA-Polymerase der *Pyrococcus species* GB-D, das erst bei 37°C die optimalen Bedingungen für seine autokatalytische Reaktion erreicht, konnten bei 4 bis 12°C Zwischenstufen jener Reaktion isoliert werden, die zur weitgehenden Aufklärung des Mechanismus des Proteinspleißens beigetragen haben [294-297]. Den daraus resultierenden und mittlerweile allgemein anerkannten Mechanismus zeigt Abbildung 65. Generell sind für das Gelingen einer Proteinspleiß-Reaktion einige essentielle Aminosäuren notwendig. Diese Aminosäuren bilden zwei katalytische Zentren, die jeweils für die Spaltung einer Peptidbindung verantwortlich sind. Die nukleophilen Aminosäuren Cys oder Ser besetzen häufig die erste Position der N-terminalen Spleißdomäne. Allerdings existieren auch spleißaktive Inteine, die an jener Position ein Gln oder die nicht nukleophile Aminosäure Pro oder Ala besitzen. Wobei im letzteren Fall die Initiierung der Spleißreaktion von derjenigen in Abbildung 65 abweicht. Es wird angenommen, dass das in Motiv B konservierte His die Nukleophilie der Aminosäure an Position 1 des Inteins verstärkt und daher die erste Peptidbindungsspaltung erleichtert. Am C-Terminus des Inteins befindet sich in der Regel auf ein His folgend ein Asn (gelegentlich auch Gln oder Asp), die beide essentiell für die Bindungsspaltung zum C-Extein sind [280, 283]. Um die gewünschte

Verknüpfung der Exteine zu gewährleisten, muss die erste Aminosäure des folgenden C-Exteins (+1 Position) ein Nukleophil sein, nämlich Cys, Ser oder Thr.

Während in Archaea Aminosäuren mit Hydroxylfunktionalität bevorzugt auftreten, befindet sich in mesophilen Organismen an dieser Position überwiegend die Thiofunktion eines Cys. Zusammen mit einem konservierten His im Motiv F der C-terminalen Spleißdomäne bilden die am Ende jener Domäne und die an Position +1 angesiedelten Aminosäuren das zweite katalytische Zentrum.

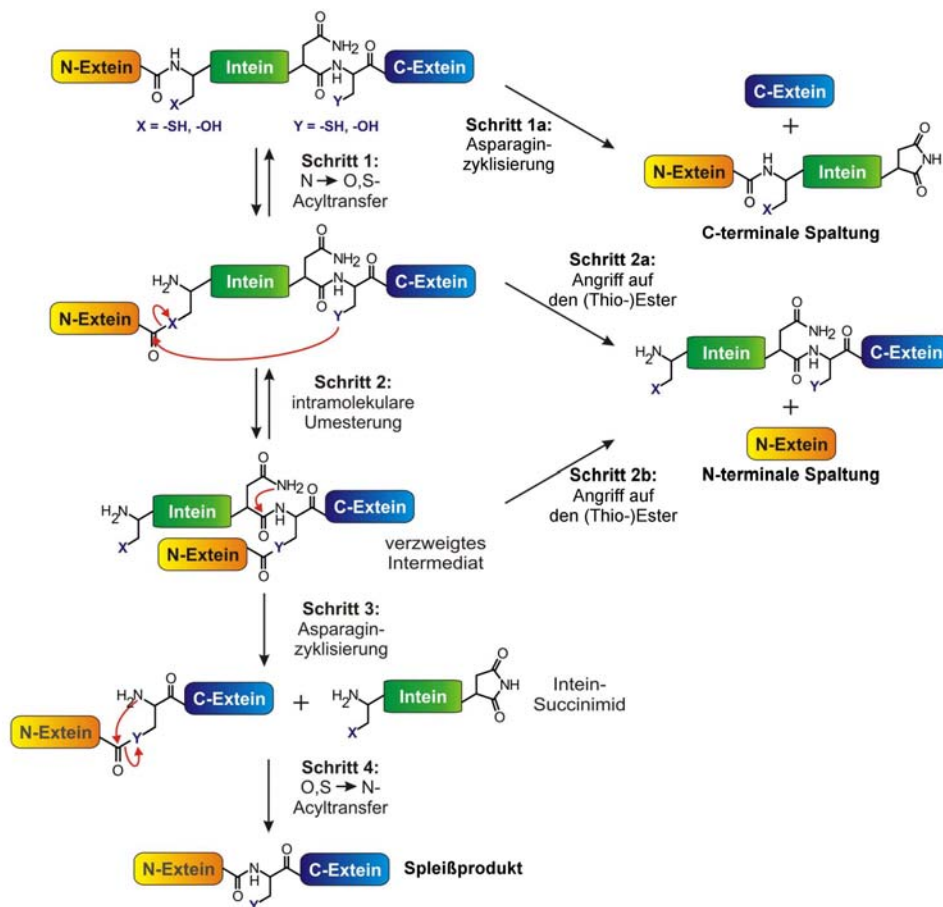


Abbildung 65. Mechanismus der Protein-Spleißreaktion. Durch den nukleophilen Angriff der Aminosäureseitenkette am N-Terminus des Inteins (X) wird ein reaktiver Thio- bzw. Oxoester gebildet. In einer nachfolgend ablaufenden intramolekularen Umesterung durch eine zweite nukleophile Aminosäure am N-Terminus des C-Exteins (Y) entsteht ein verzweigtes Intermediat. Das Intermediat spaltet durch Cyclisierung des konservierten Asparagins am C-Terminus des Inteins jenes als Succinimid-Derivat ab. Im abschließenden irreversiblen O,S → N-Acyltransfer wird eine Peptidbindung zwischen den beiden Exteinen hergestellt. Ebenfalls dargestellt sind die möglichen Nebenreaktionen, die C-terminale Spaltung (Schritt 1a) durch vorzeitige Asparagin-Zyklisierung und die N-terminale Spaltung (Schritt 2a/b) durch Angriff auf den gebildeten (Thio-) Ester.

Nachfolgend soll der Mechanismus des Proteinspleißens (Abbildung 65) detailliert erläutert werden. Den Startpunkt des Proteinspleißens markiert der nukleophile Angriff der Aminosäure an Position 1 des Inteins auf die vorhergehende Carbonylgruppe des N-Exteins. Hierbei

entsteht eine (Thio)esterbindung zwischen dem N-Extein und dem Intein. Diese hochenergetische Bindung ist nun ihrerseits Ziel des nukleophilen Angriffs der Seitenkette der +1 Aminosäure des C-Exteins. Das entstehende verzweigte Intermediat ermöglicht anschließend in einer irreversiblen Zyklisierung des Asn die Abspaltung des Inteins als Succinimiderivat. Dieser Schritt legt außerdem eine Aminfunktion frei, die in der abschließenden X→N-Acylumlagerung die native Peptidbindung als Verknüpfung der beiden Exteine herstellt. Erstaunlicherweise werden während des Proteinspleißens nicht nur zwei Peptidbindungen gespalten und nur eine geknüpft, sondern auch zahlreiche hochenergetische Zwischenprodukte gebildet. Daher kann dieser energetisch äußerst anspruchsvolle Vorgang nur effektiv ablaufen, sofern alle Teilschritte genau aufeinander abgestimmt sind, da andernfalls die Nebenreaktionen der N- bzw. C-terminalen Spaltung vermehrt auftreten können. Im ersten Fall (N-terminale Spaltung) kommt es zur Hydrolyse der gebildeten (Thio)ester-Zwischenprodukte, die in einem Reaktionsabbruch und einer Freisetzung des N-Exteins resultiert. Im zweiten Fall (C-terminale Spaltung) wird in einer verfrühten Asn-Zyklisierung das C-Extein abgespalten.

7.2. Künstlich gespaltene Inteine und das *trans*-Proteinspleißen

Drei Tatsachen führten zur Frage, ob es möglich sei, Inteine künstlich in zwei Fragmente zu teilen, um sie als Werkzeug zur gezielten Modifikation von Proteinen einsetzen zu können. Die erste Tatsache bestand in der Entdeckung der bereits im vorhergehenden Kapitel erwähnten natürlich gespaltenen Inteine. Zweitens zeigte die Kristallstruktur des VMA-Maxiinteins aus *Saccharomyces cerevisiae* (*Sce* VMA-Intein) (Abbildung 66) [298], dass sich sowohl die Homing Endonuklease, als auch die beiden Spleißsubdomänen, zu je einer einzigen, freistehenden Domäne falten. Schließlich führten noch Vergleiche der Spleißdomäne des *Sce* VMA-Maxiinteins mit derjenigen z. B. des GyrA-Miniinteins aus *Mycobacterium xenopi* (*Mxe* GyrA-Intein) [299], dem die Homing Endonuklease-Domäne fehlt, zu der Erkenntnis, dass die Faltung der Spleißdomänen sich sehr stark ähneln. In beiden Fällen konnte ein Faltungsmotiv vom Hint-Typ [300] für den Komplex aus den Spleißsubdomänen identifiziert werden. Daher besaß die Spleißdomäne jeweils die Struktur eines Hufeisens, welches überwiegend aus β -Faltblättern besteht und das eine Annäherung der N- zur C-Extein-Sequenzen bis auf wenige Angström herbeiführt.

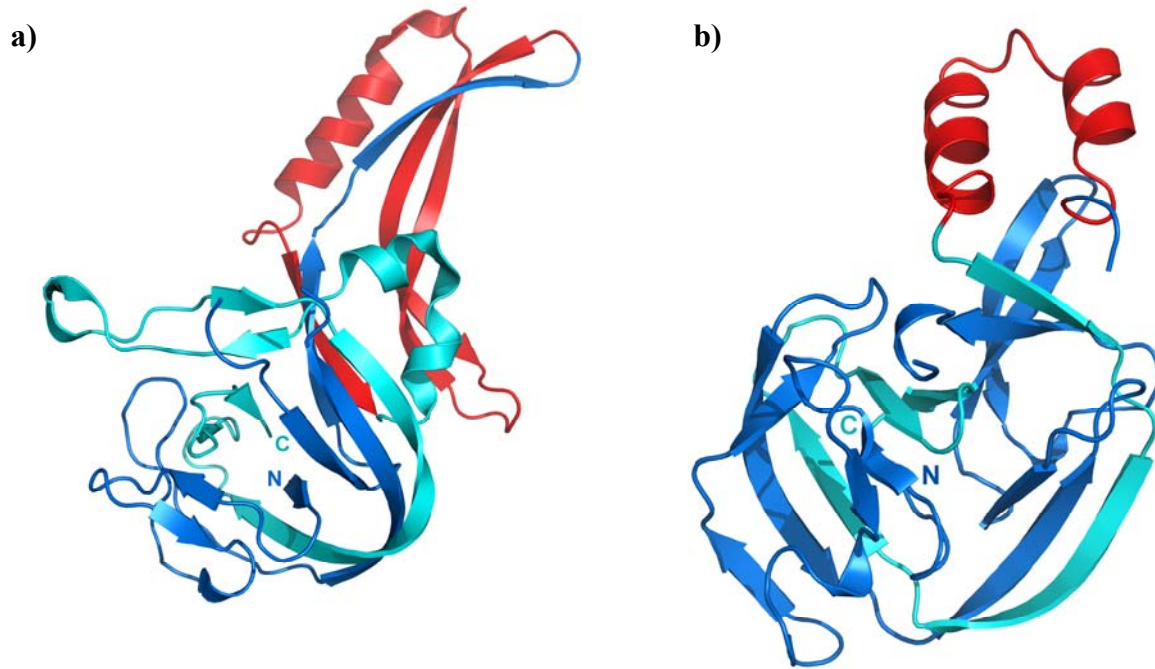


Abbildung 66. Vergleich der Kristallstrukturen des *Sce* VMA-Maxiinteins und des *Mxe* GyrA-Miniinteins. a) *Sce* VMA-Intein (PDB: 1GPP, [301]) mit Homing Endonukleasedomäne (rot) (blau: Int^N-Domäne; cyan: Int^C-Domäne). b) *Mxe* GyrA-Intein (PDB: 1AM2, [299]) mit der Aminosäuresequenz (rot), die die Endonuklease-Domäne ersetzt hat (blau: Int^N-Domäne; cyan: Int^C-Domäne). (erstellt mit Pymol, [225])

Ein entscheidender Schritt beim *trans*-Proteinspleißen im Gegensatz zum *cis*-Proteinspleißen der Maxi- und Miniinteine ist die notwendige Assoziation der beiden Inteinfragmente, die dem eigentlichen Spleißvorgang vorgelagert ist und in dessen Verlauf eine funktionsfähige Inteinstruktur konstituiert werden muss.

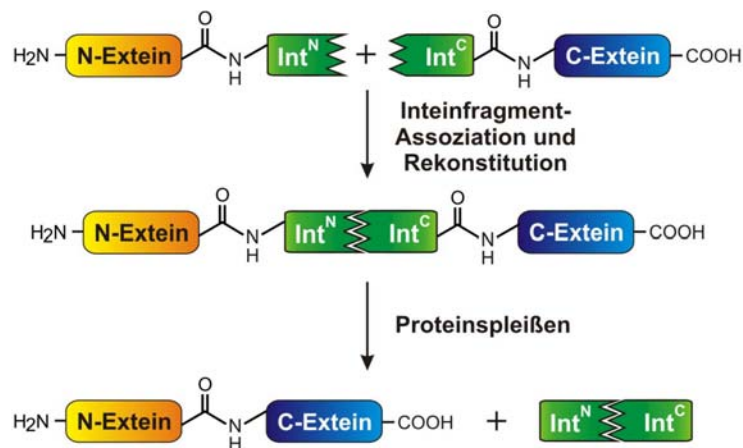


Abbildung 67. Die *trans*-Proteinspleißreaktion mit einem gespaltenen Intein. Die Gesamtheit der drei Teilschritte aus Inteinfragment-Assoziation, Rekonstitution des aktiven Proteins und das eigentliche Proteinspleißen wird als *trans*-Proteinspleißen bezeichnet.

Bei den ersten *in vivo*-Untersuchungen mit dem künstlich gespaltenen *Mycobacterium tuberculosis* RecA-Intein (*Mtu* RecA), das keine Endonuklease-Domäne mehr enthielt, konnte *trans*-Proteinspleißaktivität nachgewiesen werden [302], während jedoch der Einsatz desselben Inteins *in vitro* ein Denaturierungs/Renaturierungsverfahren zur Assoziation der beiden Fragmente und zur Rekonstitution der aktiven Struktur benötigte [303]. Um die Aktivität des *Psp* GBD Pol-Intein zu gewährleisten, muss mindestens eine Harnstoff-Konzentration von 0,36 M während der Spleißreaktion vorhanden sein [304]. Jedoch zeigt es sich bis zu denaturierenden Bedingungen von 6 M Harnstoff spleißaktiv. Im Gegensatz zu den vorstehend genannten Inteinen spleißen die künstlich gespaltenen *Ssp* DnaB- [305-307] und *Mxe* GyrA-Inteine [308] bei einem pH-Wert von 7,0 spontan. Eine Tatsache die auf das künstlich gesplattene *Sce* VMA-Miniintein nicht zutrifft. Hier ist es notwendig, die beiden Fragmente, die keine spontane Affinität zueinander zeigen, durch fusionierte Dimerisierungssysteme (Rapamycin-FKBP/FRB-System [159], Rapamycin-F_M/F_M-System [309] oder Photodimerisierung [310]) in räumliche Nähe zu bringen, um damit die Proteinspleißreaktion zu initiieren. Ein abschließender Vergleich aller genannten, künstlich oder natürlich gespaltenen Inteine führt zu der Erkenntnis, dass in der Regel einem großen N-terminalen Fragment von ca. 100-150 Aminosäuren eine wesentlich kleinere C-terminale Hälfte von ca. 35-50 Aminosäuren gegenübersteht. Diesem Trend entsprechen die nachfolgend zu besprechenden beiden Varianten des künstlich gespaltenen *Ssp* DnaB-Intein teilweise nicht.

7.3. Das *Ssp* DnaB-Intein

Den Ausgangspunkt des zweiten Projektes bilden zwei Varianten des künstlich gespaltenen DnaB-Inteins aus dem Cyanobakterium *Synechocystis* sp. Stamm PCC6803. Die genetische Information für das native *Ssp* DnaB-Maxiintein ist in das die DNA-Helikase kodierende *dnaB*-Gen insertiert. Es besteht aus 429 Aminosäuren, wovon 275 Aminosäuren auf die Endonuklease-Domäne entfallen. Eine Deletion der Endonukleasesequenz resultierte in einem künstlich gespaltenen Miniintein von 154 Aminosäuren [305]. Liu und Mitarbeiter ersetzten die Endonuklease durch eine kurze Sequenz aus Stopkodon-Ribosomenbindestelle-Startkodon und somit konnten die beiden entstehenden Inteingengfragmente unabhängig voneinander *in vivo* in *E. coli* exprimiert werden. Anschließend zeigte sich *in vivo* eine katalytische Aktivität der beiden Inteingengfragmente. Eine getrennte Expression der Inteingengfragmente (Int^N: 105

Aminosäuren und Int^C: 49 Aminosäuren) mit anschließender Aufreinigung und Reaktion *in vitro*, führte ebenso zu Spleißaktivität, wie im zuvor erfolgten *in vivo*-Experiment [306]. Die Veröffentlichung der Kristallstruktur des *Ssp* DnaB-Miniinteins im Jahre 2003 [311], veranlasste die Arbeitsgruppe Liu nach weiteren, alternativen Spaltungsstellen in der Inteinstruktur zu suchen [312]. Die Suche nach den Spaltstellen, wurde wie bereits erläutert, *in vivo* in *E. coli*-Zellen durchgeführt. Hierbei zeigten von den 13 untersuchten Spaltpositionen, die vorrangig in Schleifenregionen zu finden waren, vier die Bildung detektierbare Mengen an Spleißprodukt. Drei davon befanden sich bis zu 26 Aminosäuren N-terminal zur Spaltstelle an der Endonuklease-Position (als S0 bezeichnet) (Abbildung 68a)). Die vierte Spaltstelle (als S1 bezeichnet) befand sich lediglich 11 Aminosäuren vom N-Terminus entfernt (Abbildung 68b)). Zwar zeigte sie verglichen mit S0 nur 50% Spleißaktivität, jedoch ermöglichte sie die künstliche Synthese des N-terminalen Inteinfragments mit Festphasen-Peptidsynthese. Bei *in vitro*-Experimenten mit synthetischen Peptiden und einem rekombinant hergestellten C-terminalen Inteinfragment konnte ebenfalls Spleißaktivität an dieser Position festgestellt werden [307]. Somit war es möglich durch *trans*-Proteinspleißen künstliche Modifikationen, wie Fluorophore, andere organische Moleküle oder Biotin, an rekombinant mit dem Int^C-Fragment exprimierte Zielproteine kovalent zu verknüpfen.

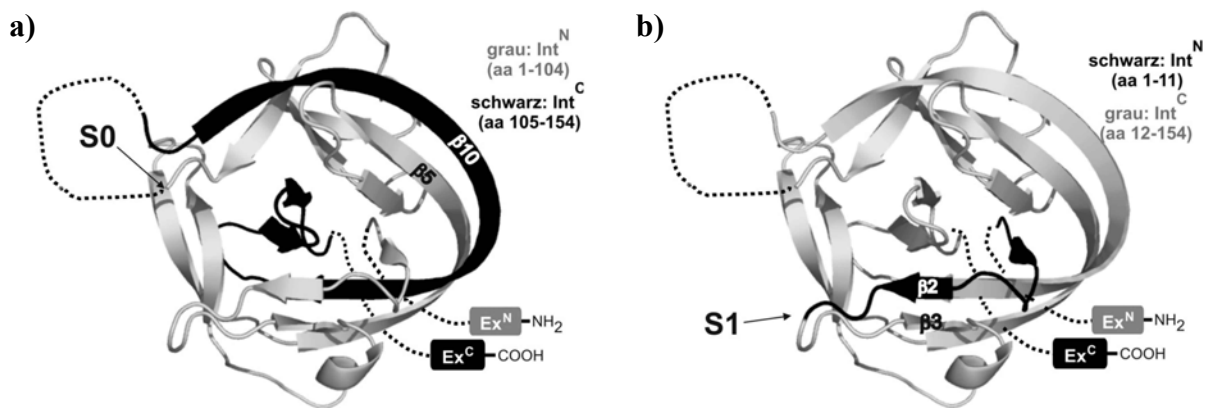


Abbildung 68. Kristallstrukturen des *Ssp* DnaB-Inteins mit den von Sun *et al.* als S0 und S1 bezeichneten Spaltstellen. a) Die Spaltstelle S0 befindet sich an der Position 104, an der im Maxiintein die Endonuklease-Domäne gefunden werden kann. Über die Bildung eines langen, antiparallelen β -Faltblattes aus $\beta 5$ und $\beta 10$ wird die Fragmentassoziiierung erleichtert. b) An der Spaltstelle S1 nach Ala11 kann hingegen nur ein sehr kleines β -Faltblatt aus $\beta 2$ und $\beta 3$ entstehen. (PDB: 1MI8, [311])

Wie bereits für das *Sce* VMA- und das *Mxe* GyrA-Intein erwähnt, faltet sich auch die Spleiß-domäne des *Ssp* DnaB-Miniinteins nach dem Strukturmotiv des Hint-Typus [311]. In diesem Fall wird es aus 12 β -Faltblättern aufgebaut, wobei die Assoziation der N- mit der C-terminalen Inteinhälfte über zahlreiche Wasserstoffbrücken und hydrophobe Kontakte die charak-

teristische hufeisenförmige Struktur ausbilden. Der Spleißprozess findet im Zentrum der Hufeisenstruktur in zwei dicht beieinander gelegenen, aber voneinander unabhängigen katalytischen Zentren statt. Weiterhin konnte der Kristallstruktur des *Ssp* DnaB Inteins entnommen werden, dass die Peptidbindung an der C-terminalen Spleißstelle eine verzerrte *trans*-Konformation besitzt, ein Phänomen, das auch bereits beim *Sce* VMA- [313, 314] und beim *Mxe* GyrA-Intein [299, 315] beobachtet werden konnte. Die hohe Ähnlichkeit des *Sce* VMA bzw. des *Mxe* GyrA Inteins zum *Ssp* DnaB-Intein zeigt sich auch in einer geringen mittleren Abweichung der Proteinrückgrate voneinander mit 1,4 Å bzw. 1,2 Å [311]. Weiterhin ermöglichte die Kristallstruktur Einblicke in die für die Assoziation notwendigen Wechselwirkungen. Beim S0 gespaltenen Intein geht die Assoziation von den beiden zueinander antiparallel angeordneten äußerst langen β -Faltblättern 5 und 10 aus (Abbildung 68a)). Im S1 gespaltenen *Ssp* DnaB-Intein hingegen kann nur ein kurzes, antiparalleles β -Faltblatt aus β 2 und β 3 gebildet werden, um eine Assoziation der Inteinhälften zu ermöglichen (Abbildung 68b)).

7.4. Evolutes Entwicklungspotential am Beispiel des *Npu* DnaE-Intein

Ein Vergleich des künstlich gespaltenen *Ssp* DnaB-Intein mit dem kürzlich veröffentlichten, natürlich gespaltenen *Npu* DnaE-Intein [316] zeigt, dass Inteine das Potential besitzen, Limitationen bezüglich Temperatur, Geschwindigkeit der Spleißreaktion und des Einsatzes denaturierender Reagenzien zu überwinden. Mit $3,5 \cdot 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ (25°C) wurde für das *Npu* DnaE-Intein eine Reaktionsgeschwindigkeit erster Ordnung gefunden, die eine Zehnerpotenz größer ist als diejenige für das an Position 104 künstlich gesplattene DnaB-Intein ($9,9 \cdot 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ (25°C); [306]). Das Optimum der Spleißreaktion erreicht das *Npu* DnaE bei 37°C mit einer Geschwindigkeitskonstanten erster Ordnung von $1,1 \cdot 10^{-2} \text{ s}$. Daher liegen die Halbwertszeiten der Spleißreaktion 20 min auseinander (63 s (*Npu* DnaE; 37°C) bzw. 21 min (*Ssp* DnaB (104); 25°C)). Über einen Temperaturbereich von 6 bis 37°C wurden während *in vitro*-Spleißreaktionen durchweg Ausbeuten größer als 75% erhalten. Das *Npu* DnaE-Intein zeigt sich auch sehr robust gegenüber denaturierenden Bedingungen. So ergab eine Spleißreaktion bei 25°C und 6 M Harnstoff noch eine Ausbeute an Spleißprodukt von 65 bis 70%.

Diese Ergebnisse der *in vitro*-Spleißreaktionen des *Npu* DnaE-Intein unterstreichen die Möglichkeit das *Ssp* DnaB-Intein durch Proteinevolution in seiner Spleißaktivität zu verbessern,

da die Optimierungen des *Npu* DnaE-Inteins lediglich das Ergebnis natürlicher Evolution sind.

7.5. Aufgabenstellung: Selektion von *trans*-Proteinspleißen durch Phagen-Display des *Ssp* DnaB-Inteins (Projekt 2)

In vitro-Studien haben gezeigt, dass beide Varianten des künstlich gespaltenen *Ssp* DnaB-Miniinteins sehr stark durch die äußeren Bedingungen, wie z. B. Temperatur oder pH-Wert, in ihrer Spleißaktivität beeinflusst werden [306, 317]. Das Optimum der Spleißaktivität liegt bei pH 7,0 und 25°C. Auch wurde schnell offensichtlich, dass die Komplexität und Größe der Exteine einen entscheidenden Einfluss auf die Ausbeute und das Verhältnis an gebildetem Spleißprodukt und den Nebenprodukten hat. Außerdem wurde festgestellt, dass Proteinspleißen schon unter leicht denaturierenden Bedingungen mit dem *Ssp* DnaB-Intein nicht mehr ablaufen konnte. Ebenso ist die verlangsamte Kinetik des an Position S1 gespaltenen Inteins für seine Anwendung von Bedeutung, da erst nach 3 bis 6 Stunden erste Spuren eines Spleißproduktes detektierbar waren [307].

Bei diesen Limitationen in Kombination mit den Ergebnissen der *in vitro*-Spleißreaktionen des *Npu* DnaE-Inteins (siehe Kapitel 7.4) könnte argumentiert werden, dass eine zeit- und materialaufwendige Proteinevolution mit dem künstlich gespaltenen *Ssp* DnaB-Intein angesichts der katalytischen Aktivität des DnaE-Inteins nicht notwendig sei. Im Bezug auf das an Position 104 gesplattene DnaB-Intein können die Argumente unterstützt werden. Jedoch kann das an Position 11 gesplattene DnaB-Intein durch das DnaE-Intein nicht ersetzt werden. Denn beim *Npu* DnaE-Intein steht dem großen Int^N- (102 Aminosäuren) ein kleines Int^C-Protein mit 36 Aminosäuren gegenüber, im an Position 11 gespaltenen *Ssp* DnaB-Intein sind die 154 Aminosäuren wie folgt verteilt: kleines Int^N- (11 Aminosäuren) und großes Int^C-Fragment (143 Aminosäuren). Hieraus ergeben sich viele potentielle Anwendungsmöglichkeiten, wie die Modifikation von Proteinen mit synthetischen Peptiden, organischen Bausteinen und un-natürlichen Aminosäuren sowie mit DNA-Sequenzen. Dadurch wäre z. B. die Immobilisierung von Proteinen an fester Phase oder auf der Oberfläche von Zellen denkbar, weiterhin ist auch die räumlich und zeitlich aufgelöste Schaltung von Proteinaktivität oder die gezielte Analyse der Aufgaben posttranslationaler Modifikationen vorstellbar oder auch lediglich die Generierung semisynthetisch, markierter Proteine, um deren Aufgabe bzw. Position im Kontext der Zelle besser und einfacher untersuchen zu können. Zweitens bietet das große *Ssp*

DnaB^C-Fragment im Rahmen der Proteinevolution einen großen Sequenzraum, der nach Mutanten mit verbessertem *trans*-Proteinspleißen im Kontext der angelegten Selektionsbedingungen durchsucht werden kann.

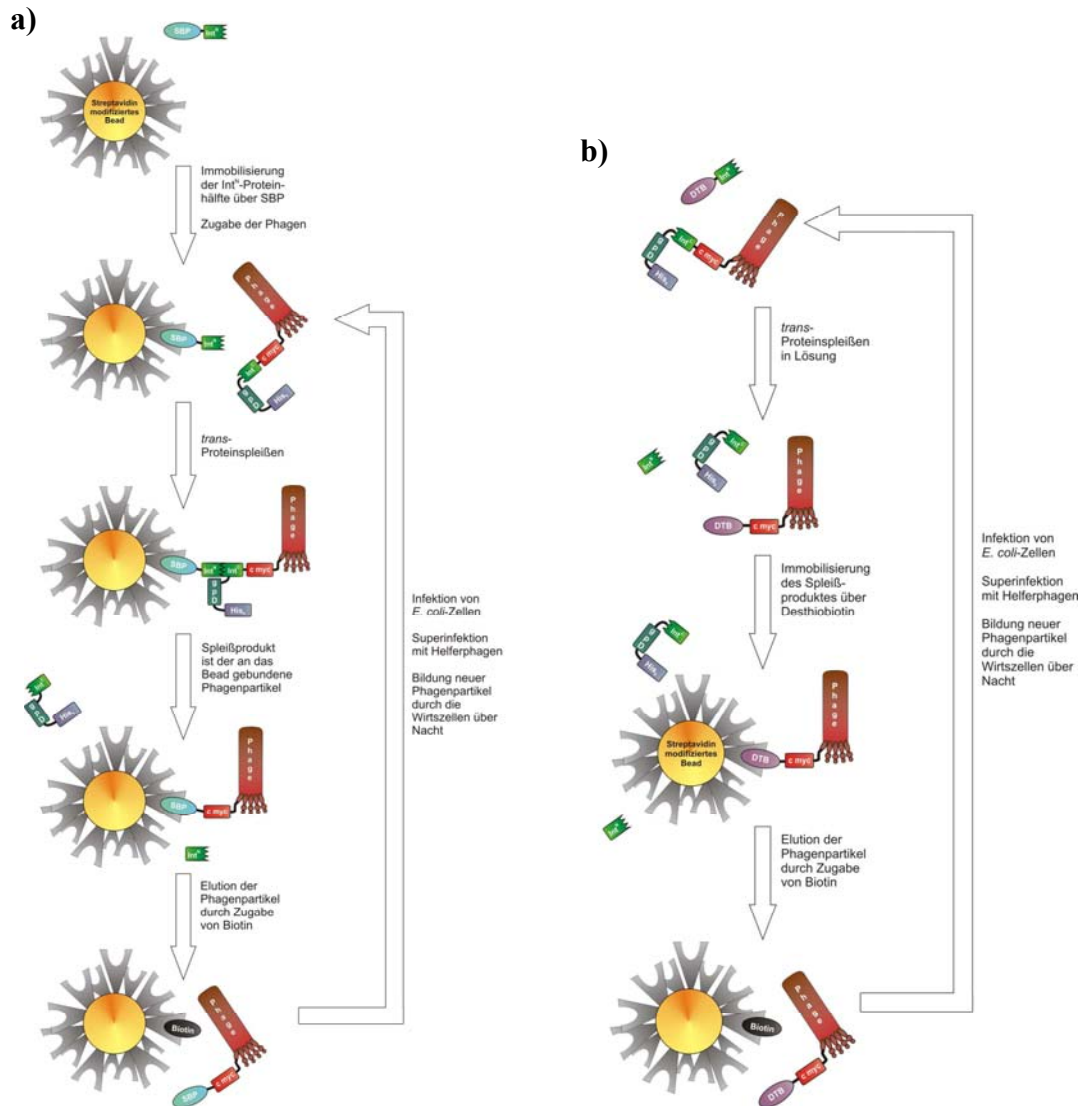


Abbildung 69. Phagen-Display als Verfahren zur Verbesserung der Spleißaktivität des gespaltenen *Ssp DnaB*-Inteins. a) Das *trans*-Proteinspleißen erfolgt zwischen der immobilisierten N-terminalen Hälfte und dem Phagen auf der Oberfläche von magnetischen Beads. Der als Spleißprodukt an die Beads gebundene Phage wird kompetitiv mit Biotin eluiert oder durch tryptischen Verdau abgelöst. b) Nach der Spleißreaktion in Lösung wird das Produkt zur Abtrennung nicht spleißaktiver Phagen an Streptavidin immobilisiert und nach diversen Waschschritten selektiv mit Biotin eluiert.

Daher sollte im zweiten Projekt dieser Doktorarbeit nicht nur das *trans*-Proteinspleißen auf der Oberfläche eines filamentösen Bakteriophagen etabliert werden, sondern nachfolgend auch eine experimentelle Methode entwickelt werden, um das Intein mittels Phagen-Display einer Proteinevolution zu unterziehen. In jenem Zusammenhang sollte es möglich sein, das -Intein und daher auch den Spleißvorgang - unterschiedlichen Selektionsbedingungen, wie Temperatur, Zeit, pH-Wert oder denaturierenden Reagenzien verschiedenster Konzentration,

zu unterwerfen. Hierzu sollte das C-terminale Inteinfragment als Fusion mit dem Hüllprotein III des M13-Bakteriophagen auf dessen Oberfläche in einem monovalenten Phagen-Display eingesetzt werden. Während des Spleißvorgangs mit einem rekombinanten Protein oder Peptid, das u. a. aus dem N-terminalen Inteinfragment besteht, sollte eine kovalente Verknüpfung zwischen dem Phagen (also pIII) und einem Protein oder einem organischen Molekül hergestellt werden. Das entstehende Spleißprodukt ermöglichte eine Immobilisierung des Phagenpartikels an einer festen Phase (Abbildung 69). Nach intensiven Waschvorgängen zur Entfernung unspezifisch gebundener Phagen können die immobilisierten Phagen entweder selektiv isoliert oder mit ihnen direkt *E. coli*-Wirtszellen infiziert werden, um eine weitere Proteinevolutionsrunde einzuleiten.

8. Materialien zu Projekt 2

8.1. Verwendete Geräte

Für eine Auflistung der verwendeten Geräte kann in Tabelle 1 in Kapitel 3.1 nachgesehen werden.

8.2. Chemikalien, Enzyme und Verbrauchsmaterialien

Eine Auflistung der Chemikalien, Enzyme und Verbrauchsmaterialien kann in Tabelle 2 in Kapitel 3.2 nachgelesen werden.

8.3. Verwendete Plasmide

Neben den bereits in Kapitel 3.3 erwähnten Vektoren, kamen in Projekt 2 auch die nachstehend beschriebenen Plasmide zum Einsatz.

8.3.1. pET28a

Der pET28a-Vektor (5369 bp) von *Novagen* versieht das Zielprotein optional mit einem N- oder C-terminalen His₆-Tag, wobei der N-terminale Tag mittels einer Thrombinerkennungsstelle entfernt werden kann. Der *lac*-Repressor (*lacI*) inhibiert die Expression durch den Promotor des T7-Phagen. Bakterien, die den Vektor in sich tragen sind gegen Kanamycin resistent und vervielfältigen das Plasmid über den ColE1 Replikationsursprung aus pBR322.

8.3.2. pSU38

Die Grundlage für den von Bartolome *et al.* veröffentlichten pSU38-Vektor (2685 bp) bildete das Plasmid pACYC184 [318]. Neben einem Kanamycin-Resistenzgen, einem *lac*-Promotor

und dem *lacZ*-Reportergen besitzt der Vektor noch ein P15A-Replikon, das zu einer geringen Kopienzahl (20-30) innerhalb der Zelle führt.

8.3.3. pHEN1

Das Plasmid pUC19 bildete den Ausgangspunkt der Konstruktion des Phagemidvektors pHEN1 (4522 bp) durch Hoogenboom *et al.* [319]. Die multiple Klonierungsstelle (engl. *multiple cloning site*, MCS) für das Zielgen wurde zwischen das Gen der PelB-Signalsequenz (5') und das Gen des (3') kloniert. Die PelB-Signalsequenz entstammt dem Organismus *Erwinia carotovora* und dient ursprünglich dem Export der Pektat-Lyase, die α -1,4-glykosidische Bindungen der Poly-Galakturonsäure spaltet [112]. Im Falle des Phagemidvektors wird das Fusionsprotein mit dem am 3'-Ende des c myc-Tags positionierten Hüllprotein pIII des fd-Phagen mit Hilfe der PelB-Signalsequenz und des Sec-Sekretierungssystems aus der Bakterienzelle ausgeschleust. Zwischen dem Gen des c myc-Tags und dem Gen des pIII-Hüllproteins befindet sich ein TAG-Stop-Kodon, um die Expression ohne das Hüllprotein in nicht-supprimierenden *E. coli*-Stämmen zu ermöglichen. Die Expression erfolgt durch IPTG-Induktion über den *lac*-Promotor, der durch Zugabe von 1 bis 2% Glukose reprimiert werden kann. Weiterhin befindet sich auf dem Vektor ein Ampicillin-Resistenzgen (*bla*), das *lacZ*-Reportergen und die Replikationsursprünge ColE1 für *E. coli* und M13 für die Bakteriophagen.

Ein Derivat des pHEN1 stellt der Vektor pDG097 dar, in dem die Antibiotika-Resistenz durch Austausch des *bla*- gegen das *cat*-Gen zu Gunsten von Chloramphenicol verändert worden ist.

8.3.4. pT7-SBP-2

Der pT7-SBP-2-Vektor (4934 bp) von *Sigma* erlaubt die N-terminale Fusion des Streptavidin-bindenden Proteins (SBP, [320]) an ein Zielprotein. Eine Abspaltung des SBP ist durch eine Enterokinase-Schnittstelle möglich. Sobald die Kontrolle des *lacI*-Repressors durch IPTG aufgehoben worden ist, wird das Fusionsgen durch die an den T7-Promotor andockende RNA-Polymerase transkribiert. Das Ampicillin-Resistenzgen und der Replikationsursprung ColE1 aus pBR322 vervollständigen den Vektor.

8.4. Mikroorganismen

8.4.1. *E. coli*-Stamm

Zusätzlich zu den in Kapitel 3.4.1 genannten *E. coli*-Stämmen, war für die Infektion mit Bakteriophagen und ihre Vermehrung der TG1-Stamm essentiell.

Stamm	Genotyp
TG1	<i>supE thi-1 Δ(lac-proAB) Δ(mcrB-hsdSM)5 (r_K⁻ m_K⁻) [F' traD36 proAB lacI^aΔM15]</i>

8.4.2. Der Helferphage: M13K07

Der von *GE Healthcare* bezogene Helferphage M13K07 [321] ist ein Derivat des Phagen M13mp1. Er besitzt eine M40I-Mutation im pII-Hüllprotein und den Replikationsursprung P15A sowie die Kanamycin-Resistenz des Transposons Tn903 innerhalb des M13-Replikationsursprungs.

8.5. Medien

8.5.1. Zur Anzucht von nicht-infizierten *E. coli*-Kulturen

Wie bereits in Kapitel 3.5.1 beschrieben wurde zur Anzucht von *E. coli*-Kulturen vorrangig LB-Medium benutzt. Eine Ausnahme bildete der TG1-Bakterienstamm, der auf M9-Minimalmedium kultiviert wurde. Diese Vorgehensweise war notwendig, da nur so sichergestellt werden konnte, dass der für die Infektion durch die Phagen essentielle F-Pilus von den Bakterien ausgebildet wurde. Die Zusammensetzung sowohl des LB- als auch des M9-Minimalmediums ist in Kapitel 3.5.1 aufgelistet, wobei dem M9 Medium für die TG1-Zellen weder Aminosäuren noch Antibiotika zugesetzt wurden.

Amylose-Puffer B:	20 mM Tris/HCl 200 mM NaCl 1 mM EDTA 10 mM Maltose pH 7,4
Diffusionslösung:	10% (v/v) Acetonitril 1% (v/v) TFA in ddH ₂ O
PBS-Puffer:	8 mM Na ₂ HPO ₄ 1,5 mM K ₂ PO ₄ 137 mM NaCl 3 mM KCl pH 7,2
PEG-Fällungslösung:	20% (w/v) PEG 8000 2,5 M NaCl in ddH ₂ O
Strep-Tag-Puffer A:	100 mM Tris/HCl 150 mM NaCl 1 mM EDTA pH 8,0
Strep-Tag-Puffer B:	100 mM Tris/HCl 150 mM NaCl 1 mM EDTA 2,5 mM Desthiobiotin pH 8,0
Strip-Lösung für Membranen:	6,3 mL 0,5 M Tris/HCl (pH 6,8) 10 mL 10% (w/v) SDS 500µL β-Mercaptoethanol ad 50 mL ddH ₂ O

TBS-Puffer: (Spleißpuffer)	50 mM Tris 300 mM NaCl 2 mM EDTA 2 mM DTT pH 7,0
TBSTT-Puffer:	50 mM Tris/HCl 300 mM NaCl 1 mM EDTA 0,05% (v/v) Tween 20 0,05% (v/v) Triton-X 100 pH 7,0
Trypsin-Lösung:	0,02 µg/µL Trypsin 40 mM NH ₄ HCO ₃ 10% (v/v) Acetonitril pH 8,1
Waschlösung:	200 mM NH ₄ HCO ₃ in 50% (v/v) Acetonitril pH 9,2
Zitronensäure-Lösung:	50 mM Zitronensäure-Monohydrat pH 4,0

9. Methoden zu Projekt 2

9.1. Molekularbiologische Techniken

9.1.1. Konstruktion der Expressions- und Phagemidplasmide

Nachstehend wird der Entstehungsprozess der einzelnen im Rahmen des Projektes 2 verwendeten Plasmide und den aus ihnen resultierenden Konstrukten erläutert. Bei PCR-Primern sind eingeführte Restriktionsschnittstellen unterstrichen und durch Punktmutations-PCR veränderte Basen fett dargestellt. Sofern „Restriktionsschnittstellen“ aufgrund von doppelsträngigen DNA-Sequenzen aus aneinander angelagerten Oligonukleotiden endständig und nicht vollständig erscheinen, wird die fehlende Basenabfolge jenseits eines vertikalen Striches aufgeführt. Die genutzten Konstrukte und die für die Klonierungen notwendigen Oligonukleotide sind im Anhang in Tabelle 11 bis 14 aufgelistet.

PelB SS-MCS-c myc-TAG- Δ pIII (pDG020): Wie bereits erwähnt, ist die Superinfektion von Zellen, in die vorher ein Phagemidplasmid eingeschleust wurde, das für das vollständige pIII kodiert, schwierig. Daher wurde in einer inversen PCR mit pHEN1 (siehe Kapitel 8.3.3, [319]) und den Primern 5'-ATATCTAGATAGGGTGGCGGCTCCGGTCCGG-3' (oHM111) sowie 5'-ATAACTAGTCCCATTTCAGATCCTCTTCTGAG-3' (oHM110) die Sequenz des pIII auf die Aminosäuren 250 bis 406 begrenzt, wobei sich die Schnittstellen in der anschließenden Religation gegenseitig auslöschten. In dem entstandenen Plasmid pDG016 wurde durch Punktmutations-PCR mit den Primern 5'-GATTACGCCAAGCTTGCGTGC AAATTCTATTTCAAGG-3' (oDG015) und 5'-CCTTGAAATAGAATTTGCACGCAAGCTTGGCGTAATC-3' (oDG016) die *SphI*-Schnittstelle zerstört. Der neu entstandene Vektor wurde pDG020 genannt.

Konstrukt 9, *PelB* SS-StrepII-gpD-DnaB^C (107-154)-c myc-TAG- Δ pIII (pDG085): Das Insert von pDG085 entstammte einem *NcoI/XhoI*-Verdau von pJZ35 (siehe Konstrukt 25) und wurde in den Vektor pDG025 (siehe Konstrukt 23) ligiert.

Konstrukt 10, StrepII-gpD-DnaB^C (107-154)-c myc-TAG (pDG087): Man ersetzte in pDG022 (siehe Kapitel 4.1.1, Konstrukt 2) die zu exprimierende DNA-Sequenz über einen Verdau mit *NcoI* und *EcoRI* durch das Insert aus pDG085 (siehe Konstrukt 9). Es resultierte

Plasmid pDG087. Aufgrund des TAG-Stop-Kodons tauchte Δ pIII nicht in der Proteinsequenz von Konstrukt **10** auf.

Konstrukt **11/11B**, MBP-DnaB^N (1-104)-His₆ (pTK56): Die Entstehung kann in Literatur [306] nachgelesen werden. Proteine die gemäß der Vorschrift in Kapitel 9.2.2 mit dem Reagenz Biotin-X-NHS modifiziert wurden, sind durch den Buchstaben „B“ gekennzeichnet.

Konstrukt **16**, *PelB* SS-His₆-gpD-DnaB^C (107-154)-c myc-TAG- Δ pIII (pDG092): Inverse PCR mit den Primern 5'-ATCCATGGCTCAGCATCACCATCACCATCACGCGAGCAAAGAAACCTTTACC-3' (oDG085) und 5'-CTGGCCATGGCCGGCTGG-3' (oDG086) veränderte im Plasmid pDG085 (siehe Konstrukt **9**) den StrepII-Tag in einen His₆-Tag. Das resultierende Plasmid pDG090 vermittelte eine Resistenz gegen Ampicillin. Durch Restriktionsverdau-freie PCR (engl. *restriction-free cloning*, [322]) mit den Primern 5'-caggtggcacttttcggggaaatgtgcgACGTTGATCGGCACGTAAGAGGTTCC-3' (oDG089) und 5'-cctatgaccccttttaataaaaaatgCTTATTAATCAGATAAAATATTTCTAG-3' (oDG090) wurde die vorhandene Resistenzkassette durch das Chloramphenicol-Resistenzgen ersetzt. Der in Großbuchstaben dargestellte Bereich diente zur Anlagerung an das erste Templat pBBR1MCS [323]. Der neu entstandene Vektor trug die Bezeichnung pDG092.

Konstrukt **21**, MBP-DnaB^N (1-104, C1A)-His₆ (pDG099): Eine Punktmutations-PCR des Plasmids pTK56 (siehe Konstrukt **11**) mit den Primern 5'-CAGAATTCTCCGGCGCGATATCTGGAGATAGTTTG-3' (oDG095) und 5'-CAAACCTATCTCCAGATATCGCGCCGGA GAATTCTG-3' (oDG096) veränderte Cys1 des Inteins in Ala. Das resultierende, nicht mehr spleißaktive DnaB^N-Fragment war auf Plasmid pDG099 kodiert.

Konstrukt **22**, *PelB* SS-c myc-TAG-pIII (pDG097): Die Kontrolle zu den bereits aufgeführten Phagemidvektoren bildete pDG097, das Derivat des pHEN1 (siehe Kapitel 8.3.3, [319]) mit der Chloramphenicol-Resistenzkassette. Deshalb wurde das Insert aus pHEN1 nach dem Verdau mit *Hind*III und *Eco*RI in pDG092 (siehe Konstrukt **16**) kloniert.

Konstrukt **23**, *PelB* SS-nat. Abl SH3-c myc-TAG- Δ pIII (pDG025): Über einen Verdau mit *Nco*I und *Xho*I von pDG017 (siehe Kapitel 4.1.1, Konstrukt **1**) konnte die Sequenz der natürlichen Abl SH3-Domäne in den Phagemidvektor pDG020 (siehe oben) kloniert werden. Dadurch entstand das Plasmid pDG025.

Konstrukt 24, SBP-MBP-DnaB^N (1-104)-His₆ (pDG104): Mit den Primern 5'-ATACTCGAG GAAATCGAAGAAGGTAAACTG-3' (oDG105) und 5'-ATAGGTACCGTGATGGTGAT GGTGATG-3' (oDG106) wurde das Insert aus pTK56 (siehe Konstrukt 11) amplifiziert. Anschließend wurde es auf einen *XhoI/KpnI*-Verdau folgend in den Vektor pT7-SBP-2 (siehe Kapitel 8.3.4) kloniert. Das daraus hervorgehende Plasmid wurde mit pDG104 bezeichnet.

Konstrukt 25, StrepII-gpD-DnaB^C (107-154)-His₆ (pJZ35): Das Insert von pJZ35 ist das Produkt einer PCR der Primer 5'-ATACCATGGCCAGTTGGAGCCACCCGCAGTTCGAA AAAGCGAGCAAAGAAACCTTTACCC-3' (oJZ035) und 5'-ATAAAGCTTACCGCAGG ATCTAATACTGTTATGG-3' (oJZ036) mit dem Templat pSB34 [324]. Es wurde nach einem Verdau mit *NcoI* und *HindIII* in den Vektor pET28a (siehe Kapitel 8.3.1) kloniert. Das entstandene Plasmid erhielt die Bezeichnung pJZ35.

Konstrukt 31, PelB SS-His₆-gpD-DnaB^C (12-154, C50S)-c myc-TAG-ΔpIII (pDG095): Weil ein Teil des Inserts einer PCR mit dem Templat pDG049 entstammt, soll zunächst die Entstehung jenes Plasmids erläutert werden. Durch Anlagerung der beiden Oligonukleotide 5'-C|CATGGCCCAGGCCTGGTCCCACCCGCAGTTTGAAAAGGGCCTGCAGGG|CATGG-3' (oDG032) und 5'-C|CATGGCCCTGCAGGCCCTTTTCAAAGTGCAGGGTGGGACCAG GCCTGGGG|CATGG-3' (oDG033) konnte die Sequenz des StrepII-Tags über einen Verdau mit *NcoI* in pHM135 kloniert werden. Die gestrichelt unterlegte *NcoI*-Schnittstelle wurde durch das Einfügen in das Plasmid-Rückgrat zerstört. Das neu entstandene Plasmid trug die Bezeichnung pDG049. Einer anschließenden PCR mit dem Templat pDG049 und den Primern 5'-TAGGATCCTCTAGTAGCACAGGAAAAAGAGTTTC-3' (oDG091) sowie 5'-GATCCTCTTCTGAGATGAG-3' (oDG092) entstammte das DnaB^C-Fragment. Es wurde nach einem Verdau mit *BamHI* und *XhoI* in pDG092 ligiert. Das Ergebnis dieses Klonierungsschrittes war das Plasmid pDG095.

Konstrukt 32, DnaB^C (12-154)-Trx-His₆ (pCL20): Die Klonierungsreaktionen, die zu pCL20 führten, ist Literatur [317] zu entnehmen.

Konstrukt 40, His₆-gpD-DnaB^C (107-154)-+2 Bibliothek-c myc-TAG (pDG105L): PCR mit dem Templat pDG092 (siehe Konstrukt 16) und dem Primer 5'-ATCCATGGCTCAGCATC ACCATCACCATCACGCGAGCAAAGAAACCTTTACC-3' (oDG085) sowie dem degenerierten Primer 5'-TAGCGGCCCGCCTCGAGCTGCTCMNACTGTTATGGACAATGATG

TC-3' (oDG107) lieferte die DnaB^C-Bibliothek an Position +2. Die Basen des degenerierten Kodons sind kursiv dargestellt. Das PCR-Produkt wurde nach dem Verdau mit *Bam*HI und *Not*I in das Plasmid pDG092 ligiert. Als Klonierungsprodukt entstand der Vektor pDG105L.

9.2. Protein-Techniken

Außer der in Kapitel 4.3.3.1 beschriebenen Protein-Aufreinigung über die Affinität des His₆-Tags zu immobilisierten Ni²⁺-Ionen wurden im Projekt 2 auch diejenige des StrepII-Tag zu Strep-Tactin bzw. des MBP zu Amylose genutzt. Die Puffer und Lösungen, die zum Einsatz kamen, sind im Kapitel 8.6 aufgeführt.

9.2.1. Chromatographische Proteinaufreinigung

9.2.1.1. Affinitätschromatographie mittels des StrepII-Tags

Strep-Tactin, ein Derivat des Streptavidin, bindet mit einem K_d-Wert von 1 µM an die auch als StrepII-Tag bezeichnete Oktapeptid-Sequenz „WSHPQFEK“ [325]. Zur Elution wird die reversible Bindung des Biotin-Derivats Desthiobiotin genutzt, das zum einen in einer Konzentration von 2,5 mM die Interaktion des StrepII-Tags aufhebt und zum anderen durch HABA (2-(4'-Hydroxy-azophenyl)-benzoesäure) selbst von der Strep-Tactin-Matrix verdrängt wird. Aus diesem Grund ist der mehrfache Einsatz der Strep-Tactin-Matrix möglich.

Gravity-Flow-Säulen der Firma *Biorad* wurden mit dem Strep-Tactin-Säulenmaterial befüllt und anschließend mit 10 Säulenvolumen Strep-Puffer A (100 mM Tris/HCl, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, pH 8,0) äquilibriert. Daraufhin wurde der Überstand mit den löslichen Proteinen nach dem Zellaufschluss (siehe Kapitel 4.3.2) zweimal auf die Säule gegeben. Nicht bindungsfähige Proteine wurden durch intensives Waschen (bis zu 50 Säulenvolumina) mit Strep-Puffer A entfernt. Die Elution der StrepII-Tag modifizierten Proteine erfolgte durch den Strep-Puffer B, der 2,5 mM Desthiobiotin enthielt.

9.2.1.2. Affinitätschromatographie an immobilisierter Amylose

Die Protein-Aufreinigung mit der Amylose-Matrix basiert auf der Affinität gegenüber dem Maltosebindenden Protein (MBP) und MBP-Fusionsproteinen. Da das Disaccharid Maltose genauso wie das Polysaccharid Amylose aus α -1,4-glykosidisch verknüpften Glukoseeinheiten besteht, kann die Bindung von Maltose an das MBP die Interaktion mit der Amylose-Säule aufheben. Die mehrfache Nutzung des Amylose-Säulenmaterials ist möglich, jedoch nimmt die Bindungskapazität mit der Zeit ab, da endogen in *E. coli* gebildete Amylase das Säulenmaterial zerstört. Zugabe von 0,2% (v/v) einer 50%igen (w/v) Glukoselösung in das Expressionsmedium bewirkt allerdings die Reduktion der Bildung des Enzyms Amylase.

Zur Aufreinigung von MBP-Fusionsproteinen über die Amylose-Matrix wurde das Batch-Verfahren in Gravity-Flow-Säulen genutzt. Zunächst wurde ein Säulenvolumen von 1 bis 3 mL mit 10 bis 30 mL Amylose-Puffer A (20 mM Tris/HCl, 200 mM NaCl, 1 mM EDTA, pH 7,4) äquilibriert. Danach wurde das Zelllysate zweimal aufgetragen und anschließend nicht bindende Proteine mit ca. 10 bis 15 Säulenvolumen Amylose Puffer A gewaschen. Die Elution erfolgte durch Amylose Puffer B, der zusätzlich 10 mM Maltose enthielt.

9.2.2. Modifikation von Proteinen mit dem Biotin-X-NHS-Reagenz

Das Reagenz Biotin-X-NHS [326] von *Calbiochem* ist in der Lage die N-terminale und die an den Lys-Seitenketten befindliche Aminofunktion über eine C6-Brücke mit Biotin zu modifizieren. Diese Veränderung von Konstrukt **11** ermöglicht die Bindung des Spleißproduktes an Streptavidin modifizierte, magnetische Beads.

Zum Einsatz kam die wasserlösliche Variante des Biotin-X-NHS-Reagenzes. Um eine 10 mM Lösung zu erhalten wurde 1 mg in 180 μ L sterilem ddH₂O gelöst und das nach Gl. 13 bestimmte Volumen der Lösung dem Protein hinzugefügt. Die Reaktionsdauer bei ca. 2°C betrug 2 h. Nicht umgesetztes Reagenz wurde durch Hydrolyse inaktiviert oder durch Dialyse aus der Proteinlösung entfernt.

$$n_{\text{Biotin}} = V_{\text{Protein}} \cdot [\text{Protein}] \cdot \frac{1}{M_{\text{Protein}}} \cdot \frac{20 \text{ mmol Biotin}}{1 \text{ mmol Protein}} \quad (\text{Gl. 12})$$

Wobei n_{Biotin} die Biotinstoffmenge in mmol, V_{Protein} das Volumen der Proteinlösung, $[\text{Protein}]$ ihre Konzentration in mg/mL und M_{Protein} die molare Masse des Proteins in mg/mmol bezeichnet. Experimente zeigten, dass ein 20-facher Überschuss des Biotin-Reagenzes gegenüber dem Protein zu einer Modifikation mit 4 bis 6 Biotinmolekülen führt. Das Volumen der 10 mM Biotin-Lösung (V_{Biotin}) in μL wird über die nach Gl. 12 bestimmte Biotin-Stoffmenge (n_{Biotin}) berechnet.

$$V_{\text{Biotin}} = n_{\text{Biotin}} \cdot \frac{1000000 \mu\text{L}}{10 \text{ mmol}} \quad (\text{Gl. 13})$$

9.2.3. „Strippen“ von Membranen für Western-Blots

Um z. B. die Position oder die Menge des Spleißproduktes mittels zwei verschiedener Antikörper vergleichbar zu bestimmen, wurde das Verfahren des „Strippens“ der PVDF-Membran des Western-Blots genutzt. Durch diese Methode werden die Antikörper, die das auf der PVDF-Membran immobilisierte Protein gebunden haben und die Blockreagenzien denaturiert und entfernt.

Die PVDF-Membran wurde in einer 50 mL-Schraubröhre mit 50 mL Strip-Lösung für Western-Blots (6,3 mL 0,5 M Tris/HCl (pH 6,8), 10 mL 10% (w/v) SDS, 500 μL β -Mercaptoethanol, ad 50 mL ddH₂O) unter leichtem Schütteln für 30 min im Wasserbad bei 50°C inkubiert. Danach wurde die Membran so lange mit Waschpuffer für Western-Blots gewaschen bis kein Geruch von β -Mercaptoethanol mehr detektierbar war (ca. 3 bis 5 Waschschrte). Abschließend wurde die Membran mit dem für den nächsten Antikörper adequaten Blockpuffer für ca 1,5 h bei Raumtemperatur inkubiert.

9.3. Peptidchemie

Die in Kapitel 4.4 genannten Methoden der Peptidchemie bezüglich der Abspaltung vom Harz, Entschützung der Seitenkettenfunktionalitäten, Aufreinigung mittels präparativer HPLC und photometrischen Quantifizierung wurden auch für Pep2 (Desthiobiotin-KKESG-DnaB^N (1-11); kurz: DTB-DnaB^N (1-11)) benutzt, jedoch wurde die allgemeine Arbeitsvorschrift (siehe Kapitel 4.4.1) wie folgt abgewandelt und ergänzt.

9.3.1. Allgemeine Arbeitsvorschrift für die automatisierte Peptidsynthese

Im Gegensatz zu Pep1 entstand Pep2 unter Verwendung des automatischen Peptidsynthesesystems „Syro XP“ der Firma *Multisyntech*. Zum Einsatz kam nun ein Wang-Harz, das mit der ersten Aminosäure der Sequenz bereits beladen war. Außerdem wurde das Cys an Position 1 der DnaB^N-Sequenz, um Racemisierung auszuschließen, als Pentafluorophenylaktivester-Baustein in einer Stickstoff durchströmten Glasfritte von Hand an die bereits vorhandene Peptidkette angehängt. Alle nachfolgenden Kupplungsschritte erfolgten erneut automatisch. Die verzweigtkettigen Aminosäuren (Ile2, Leu7, Ile8 und Leu10) sowie Asp5 wurden jeweils in einem Doppelkupplungsschritt der Peptidkette hinzugefügt. Die Modifikation des N-Terminus mit Desthiobiotin erfolgte erneut von Hand in der Glasfritte.

Nach einem Quellschritt des Harzes in DMF (10 min) wurde die automatische Aminosäurekupplung nach der in Kapitel 4.4.1 beschriebenen Vorschrift durchgeführt. Auf die Vollendung der Peptid-Sequenz mit Ile2 folgend, wurde das Harz in eine Glasfritte überführt und die Fmoc-Schutzgruppe mit 40%iger (v/v) Piperidinlösung in DMF entfernt. Zur Entfernung von Base-Rückständen schlossen sich intensive Waschschrte des Harzes mit DMF an. Nun wurde der Reaktionsmix aus 5 eq. des Cys-Bausteins (Fmoc-Cys(Trt)-OPfp), 4,8 eq. HBTU und 6 eq. NMM (N-Methylmorpholin) in die Glasfritte gefüllt und 2 h Stickstoff durch die Lösung geleitet. Nach den erneuten Waschschrten mit DMF wurde die restliche Aminosäuresequenz des N-Exteins automatisch angehängt. Die abschließende Modifikation des N-Terminus mit Desthiobiotin erfolgte in der Glasfritte nach der oben beschriebenen Methode, wobei der Cys-Baustein durch das Desthiobiotin ersetzt wurde. Um eine quantitative Kupplung des Reagenzes zu gewährleisten, wurde zum einen eine Doppelkupplung genutzt und zum anderen die Inkubation des Harzes mit dem Reaktionsmix im zweiten Schritt auf 14 h ausgedehnt.

9.4. Techniken zur Durchführung des Phagen-Display

Die für die Spleißreaktion und das anschließende intensive Waschen der immobilisierten Phagenpartikel notwendigen Puffer sind in Kapitel 8.6 aufgeführt.

9.4.1. Präparation von Phagenpartikeln

Rekombinante Phagenpartikel wurden durch PEG-Fällung [327] aus dem Überstand einer Übernachtskultur von infizierten *E. coli* TG1-Zellen abgetrennt. Dies geschah nach folgendem Protokoll.

In 10 mL 2xYT-Medium (Cam³⁴, 2% Glc) wurden TG1-Zellen mit dem gewünschten Phagemidvektor bei 37°C und 250 Upm bis zu einer OD₆₀₀ von 0,4 bis 0,6 inkubiert. Die Zellkultur wurde anschließend im Wasserbad bei 37°C für 30 min mit dem Helferphagen M13K07 infiziert. Hierbei darf ein bestimmtes Verhältnis zwischen Helferphagen und *E. coli*-Zellen, das als MOI (engl. *multiplicity of infection*) bezeichnet wird nicht unterschritten werden. Im Falle von noch exponentiell wachsenden Zellen darf die MOI nicht den Faktor 10 unterschreiten [328], d. h. es müssen der Zellkultur 10-mal mehr Helferphagen zugesetzt werden als sie Bakterien enthält. In den vorliegenden Experimenten wurde stets eine MOI von 50 gewählt. Nach der Infektion wurden die Zellen durch Zentrifugation bei Raumtemperatur und 1000 g 10 min pelletiert. Daraufhin wurden die infizierten Bakterien in 30 mL frischem 2xYT-Medium (Cam³⁴, Kan⁵⁰) resuspendiert und bei 30°C und 270 Upm über Nacht in einem 100 mL Erlenmeyerkolben kultiviert. Nun wurden die Zellen durch zwei Zentrifugationsschritte (3000 g, 4°C, 10 min) möglichst vollständig vom Medium abgetrennt. Der resultierende, die Phagenpartikel enthaltende Überstand wurde mit 7 mL PEG-Fällungslösung versetzt, gut vermischt und mindestens 1 h auf Eis inkubiert. Die anschließende Pelletierung der Phagen erfolgte durch Zentrifugation bei 10000 g für 15 min bei 4°C. Der Überstand wurde gründlich entfernt und das Phagenpellet in 200 bis 300 µL TBS-Puffer gelöst. Unlösliche Bestandteile wurden in einem weiteren Zentrifugationsschritt (10000 Upm, 4°C, 5 min) entfernt. In der so geklärten Lösung wurde die Konzentration an Phagenpartikeln pro mL photometrisch durch Messung der Absorption bei 270 nm bestimmt. Hierbei gilt laut Literatur [329], dass eine Absorption von $A_{270} = 1,0$ einer Phagenpartikel-Konzentration von $1,1 \cdot 10^{13}$ Phagen pro mL entspricht, sofern das Phagemidplasmid eine Größe von ca. 5 kb aufweist. Für die Konzentrationsbestimmungen der Phagenpartikel muss in den nachfolgenden Experimenten allerdings einberechnet werden, dass in der Regel beim monovalenten Phagen-Display nur max. 10% der gesamten Phagenpartikel Hybridphagen sind.

9.4.2. Titerung von Phagenpartikeln durch Infektion von Bakterienzellen

Die oben genannte Methode zur Bestimmung der Phagenkonzentration ist nur bei hohen Phagentitern ($> 5 \cdot 10^{13}$ Phagen/mL) anwendbar und fehleranfällig für Verunreinigungen im Puffer. Außerdem ist die Bestimmung der Hybridphagen lediglich als grobe Abschätzung zu verstehen. Zur genaueren Ermittlung der Hybridphagen-Konzentration wird eine Verdünnungsreihe der Phagenlösung angesetzt und diese benutzt, um eine festgelgte Menge an Bakterienzellen zu infizieren. Während der Infektion wird das Phagemidplasmid in die Zellen eingeschleust, die nun aufgrund der durch das Plasmid neu erworbenen Antibiotika-Resistenz in Selektionsmedium überleben. Deshalb kann von der Anzahl an Kolonien auf Platten mit entsprechendem Antibiotikum auf die Phagenkonzentration rückgeschlossen werden. Es ist unerlässlich eine Mehrfachbestimmung durchzuführen, wobei bei einer bzw. besser bei mehreren die MOI unterhalb von 1 liegen sollte.

In der Praxis wurden 100 μL TG1-Zellen ($\text{OD}_{600} \approx 1$) mit 50 μL der Phagenverdünnungsreihe für 20 min im Wasserbad bei 37°C inkubiert. Daraufhin wurden 10 μL der infizierten Zellen auf ein Filterpapier aufgetragen, das auf der Oberfläche einer 2xYT-Festmediumplatte (Cam³⁴, 2% Glc) lag [330]. Nach Inkubation über Nacht bei 30°C, konnte die Anzahl der Kolonien bestimmt und gemäß Gl. 14 in die kolonienbildenden Einheiten (engl. *colony forming units*, cfu) pro mL umgerechnet werden.

$$[\text{Phage}] = \frac{N \cdot V_{\text{gesamt}}}{10 \mu\text{L} \cdot V_{\text{Phage}} \cdot F_{\text{verd.}}} \quad (\text{Gl. 14})$$

mit:

[Phage]	Hybridphagenkonzentration in cfu/mL
N	Anzahl gezählter Kolonien
V_{gesamt}	Volumen des Infektionsansatzes (150 μL)
V_{Phage}	Volumen der verdünnten Phagenlösung (50 μL)
$F_{\text{verd.}}$	Verdünnungsfaktor der Phagenlösung

9.4.3. Titerung der Helferphagen durch Infektion von Bakterienzellen

Bei der Titerung der Helferphagen wird ausgenutzt, dass infizierte Bakterienzellen langsamer wachsen als nicht-infizierte. Daher zeigen weniger dicht bewachsene Bereiche in Zellen enthaltendem Top-Agar infizierte Kolonien an. Jene Bereiche bezeichnet man als Plaques und ermittelt daher die Konzentration des Helferphagen in Plaques-bildenden Einheiten (engl. *plaques forming units*, pfu) pro mL.

Bei der Untersuchung der Helferphagen-Konzentration wurde mit einer Verdünnungsreihe der M13K07-Lösung begonnen. Von dieser wurden 10 µL mit 100 µL TG1-Zellen ($OD_{600} \approx 1$) im Wasserbad bei 37°C für 20 min inkubiert. Anschließend wurden die infizierten Zellen mit 3 mL geschmolzenem 2xYT Top-Agar gemischt, der im Wasserbad auf maximal 50°C temperiert wurde und goss die Top-Agar-Zellsuspension auf vorgewärmte LB-Festmediumplatten. Nach Inkubation bei 37°C über Nacht wurde die Anzahl der Plaques gezählt und über Gl. 15 die Konzentration bestimmt.

$$[\text{Helferphage}] = \frac{N \cdot V_{\text{gesamt}}}{110 \mu\text{L} \cdot V_{\text{Helferphage}} \cdot F_{\text{verd.}}} \quad (\text{Gl. 15})$$

mit:

[Helferphage]	Helferphagenkonzentration in pfu/mL
N	Anzahl gezählter Plaques
V_{gesamt}	Volumen des Infektionsansatzes (110 µL)
$V_{\text{Helferphage}}$	Volumen der verdünnten Helferphagenlösung (10 µL)
$F_{\text{verd.}}$	Verdünnungsfaktor der Phagenlösung

9.4.4. Der Phagen-ELISA

Ziel des enzymgebundenen Immunosorbent Assay (engl. *Enzyme Linked Immunosorbent Assay*, ELISA) ist die photometrische Detektion und Quantifizierung eines immobilisierten Antigens oder Antikörpers durch einen selektiven zweiten Antikörper bzw. ein Enzym-Konjugat. In der vorliegenden Arbeit sollte das Hüllprotein pVIII des Bakteriophagen M13 durch das anti M13pVIII/HRP-Konjugat der Firma *GE Healthcare* detektiert werden. Eine qualitative Abschätzung der Phagenmenge erlaubte die Umsetzung des Substrates ABTS (Diammo-

nium-2,2'-azinobis-(3-ethyl-benzthiazolin-6-sulfonsäure)) in Gegenwart von H_2O_2 und eine anschließende Absorptionsbestimmung bei 410 nm nach variablen Zeitpunkten.

Nachdem die Beads mit den immobilisierten Phagen 30 min im Schüttelheizblock bei 25°C mit einer 3%igen (w/v) BSA-Lösung in PBS-Puffer geblockt worden waren, wurden sie mit einer 1:5000 Verdünnung des HRP-Konjugates in PBS-Puffer mit BSA für 1 h inkubiert. Daraufhin wurden sie fünfmal mit TBST- und zweimal mit PBS-Puffer gewaschen, um unspezifisch bindendes Konjugat zu entfernen. Anschließend wurden 2 mL der ABTS-Substratlösung mit 3,5 μL H_2O_2 versetzt und die Beads mit ca. 200 μL des Flüssigkeitengemisches 5 bis 20 min inkubiert. Sobald sich die grüne Farbe des gebildeten radikalischen Kations zeigte, wurden die Beads von der Lösung abgetrennt und die Absorption bei 410 nm bestimmt.

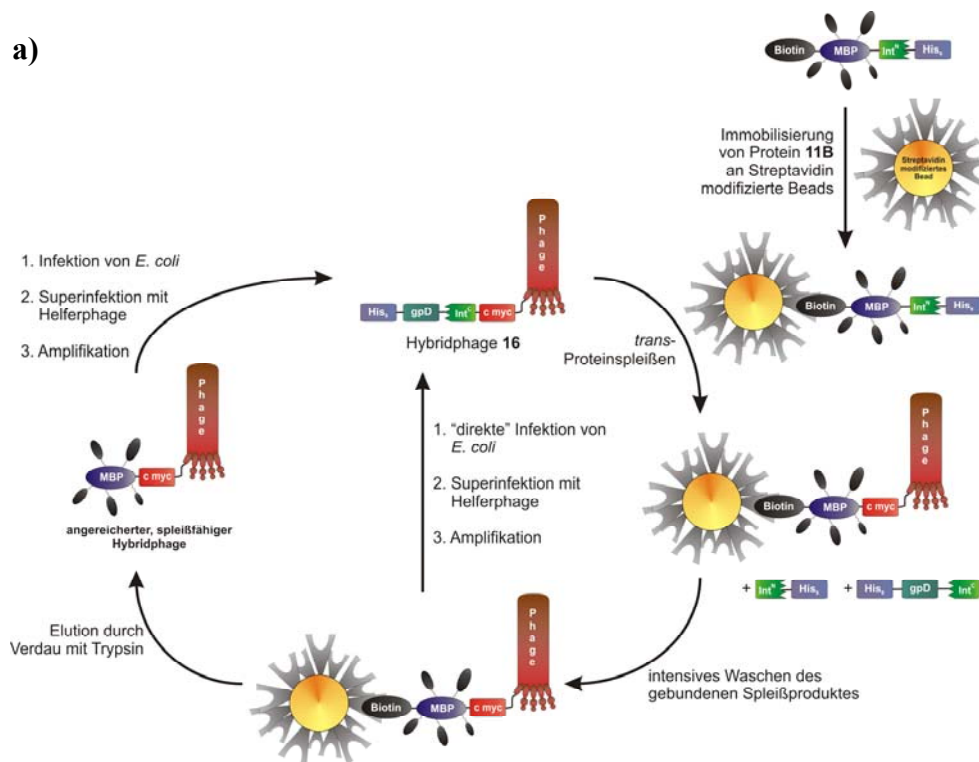
9.4.5. Durchführung eines Biopanning-Schrittes

9.4.5.1. Biopanning mit dem an Position 104 gespaltenen *Ssp* DnaB-Intein

Beim Phagen-Display mit dem an Position 104 künstlich gespaltenen *Ssp* DnaB-Miniintein werden die Aminosäuren 107-154 als Fusion mit pIII auf der Oberfläche des M13 Phagen präsentiert. Den Spleißpartner bildet das N-terminale DnaB-Fragment, das aus den Aminosäuren 1 bis 104 besteht. Als N-Extein fungierte zuerst ein Biotin-modifiziertes MBP und danach ein Fusionsprotein aus SBP und unmodifiziertem MBP. In beiden Fällen war eine Immobilisierung des N-Exteins und dementsprechend auch später des Spleißproduktes durch Streptavidin modifizierte, magnetische Beads möglich (Abbildung 70). Das C-Extein bildete in allen Reaktionen das pIII-Hüllprotein der Phagenpartikel. Durch die kovalente Verknüpfung des C- mit dem N-Extein während des Spleißprozesses wird auch der Phage an die Beads gebunden. Der nun folgende Abschnitt beschreibt die experimentellen Bedingungen, die zu den besten Ergebnissen führten.

Nachdem das gewünschte Volumen an magnetischen Beads über Nacht bei 6°C in PBS-Puffer mit 3% (w/v) BSA und 0,05% (v/v) Tween 20 geblockt worden war, wurde das DnaB^N (1-104) enthaltende Protein (25-facher Überschuss bezüglich der Bindekapazität der Beads) am Streptavidin immobilisiert. Um überschüssiges, nicht gebundenes Protein zu entfernen, wurde 4-mal kurz mit je 500 μL und 1-mal 27 min unter Dauerschütteln (500 Upm) bei 30°C mit 500 μL TBSTT-Puffer (2 mM DTT) gewaschen. Zur Entfernung des Detergenz folgten 3

kurze Waschschr tte mit je 500 μL TBS-Puffer (2 mM DTT). Die so präparierten Beads wurden 2,5 h bei 25°C mit den in TBS-Puffer (2 mM DTT) gelösten Phagenpartikeln inkubiert. Um nicht reagierte und somit auch nicht immobilisierte Phagenpartikel von den Beads zu entfernen wurde ein stringentes Waschprotokoll absolviert. Zuerst wurde mit 500 μL detergentenhaltigem TBSTT-Puffer + 2 mM DTT 3-mal kurz, 3-mal für 11 min bei 25°C und 1-mal für 27 min bei 30°C sowie erneut 5-mal kurz gewaschen. Abschließend folgten noch 4 kurze Waschschr tte mit detergentenfreiem TBS-Puffer + 2 mM DTT. Die so vorbereiteten Beads konnten nun entweder direkt zur Infektion von 10 mL *E. coli* TG1-Zellen ($\text{OD}_{600} \approx 0,5$) für 30 min im Wasserbad bei 37°C eingesetzt werden, oder die immobilisierten Phagen wurden bei 37°C durch 30 min Verdau mit Trypsin (1 mg/mL) von den Beads abgelöst. Anschließend wurden die Bakterien mit dem Überstand des tryptischen Verdau bei 37°C im Wasserbad für 30 min infiziert. Unabhängig von der Wahl des Infektionsweges für die gewonnenen Phagenpartikel wurden die infizierten Zellen schließlich mit dem Helferphagen (MOI = 50) für 30 min bei 37°C superinfiziert. Alle nachfolgenden Arbeitsschr tte sind am Anfang des Protokolls zur Präparation von Phagenpartikeln (siehe Kapitel 9.4.1) beschrieben. Mit der Bildung neuer Phagenpartikel über Nacht endete ein Biopanningschritt.



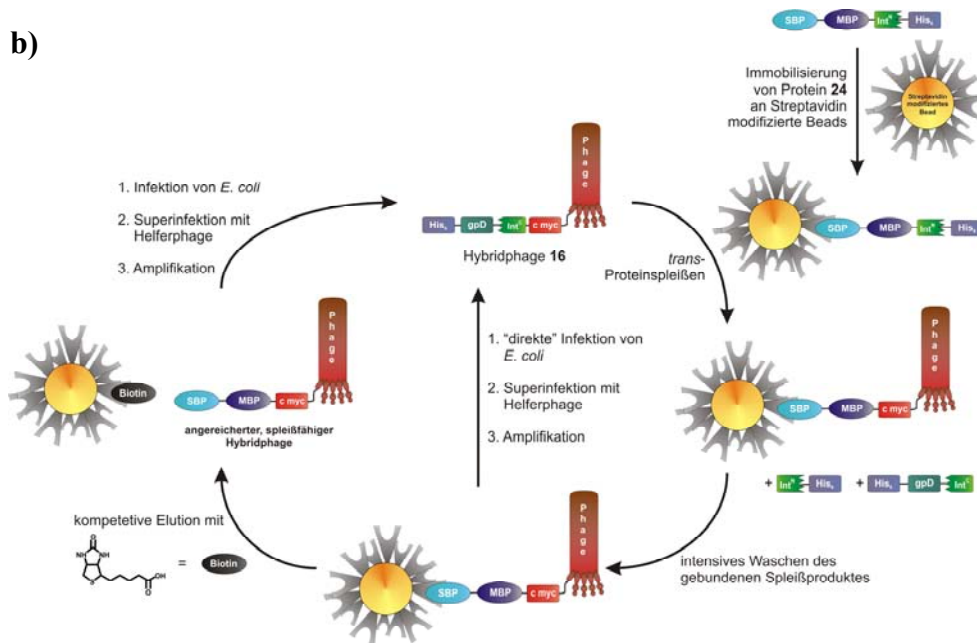


Abbildung 70. Schematische Darstellung eines Biopanningschrittes mit Phage 16 (DnaB^C (107-154)) und Protein 11B (DnaB^N (1-104)) bzw. 24 (SBP-DnaB^N (1-104)). a) Immobilisierung des Phagenpartikel an die Beads durch *trans*-Proteinspleißen mit dem an die Beads gebundenen 11B (DnaB^N (1-104)). Nach intensiven Waschschritten wird der angereicherte Hybridphage entweder direkt mit Bakterienzellen inkubiert oder durch Verdau mit Trypsin von den Beads abgelöst. b) Das an die Beads gebundene Spleißprodukt aus Phage 16 (DnaB^C (107-154)) und Protein 24 (SBP-DnaB^N (1-104)) kann nach dem Waschprozess neben der direkten Infektion auch selektiv mit Biotin von den Beads verdrängt werden (gpD: Hüllprotein des λ -Phagen, MBP: Maltose-bindendes Protein, SBP: Streptavidin-bindendes Protein).

9.4.5.2. Biopanning mit dem an Position 11 gespaltenen *Ssp* DnaB-Intein

Diese Spaltposition ermöglicht eine Präsentation des überwiegenden Teils des DnaB-Inteins auf der Oberfläche des Bakteriophagen. Als Spleißpartner ist lediglich ein kurzes Peptid notwendig, das künstlich herstellt verschiedenste Modifikationen aufweisen kann. Im durchgeführten Experiment wurde eine Desthiobiotin-Modifikation am N-Terminus des Peptids eingesetzt, sodass das Spleißprodukt (Desthiobiotin-c myc-Phage) an Streptavidin immobilisiert werden konnte (Abbildung 71). Anschließend wurde es durch die höhere Affinität von Biotin zu Streptavidin selektiv von den Beads eluiert. Nachfolgend wird das experimentelle Vorgehen mit Pep2 erläutert.

An die Präparation der Phagenpartikel (ca. 55 bis 75 nM Hybridphagen) schloss sich eine Inkubation für 18 bis 20 h bei 25°C mit einem 100-fachen Überschuß an Pep2 (5,5 bis 7,5 μ M) in TBS-Puffer mit 2 mM DTT an. Zur Entfernung des überschüssigen Peptids wurde drei Mal für 1 h gegen ca. 100 mL TBS-Puffer (2 mM DTT) dialysiert. Hierbei wurden 1,5 mL Reaktionsgefäße verwendet, in deren Deckel ein Loch geschnitten und jenes mit einer Dialysemembran (MWCO: 50 kDa) verschlossen wurde. Sowohl das Reaktionsgefäß als auch

die Membran waren vorher über Nacht mit TBS-Puffer (3% (w/v) BSA und 0,05% (v/v) Tween 20) geblockt worden, um unspezifische Anlagerung des Phagen an die Oberfläche zu minimieren. Der nächste Schritt bestand in der Immobilisierung des Spleißproduktes an Streptavidin modifizierte, magnetische Beads. Die Beads wurden analog zu Kapitel 9.4.5.1 über Nacht geblockt und anschließend intensiv gewaschen. Das Volumen an Beads ($c = 1 \text{ mg/mL}$, Kapazität: ca. 1 nmol biotinyliertes Oligonukleotid (dT)) wurde so gewählt, dass die Bindekapazität ca. einem Drittel der Konzentration von Pep2 entsprach. Der dialysierte Spleißansatz wurde 1 h bei 25°C mit den Beads inkubiert. Bevor das Spleißprodukt eluiert wurde, wurden die Beads einer intensiven Waschprozedur (3-mal kurz, 3-mal 17 min bei 25°C , 1-mal 45 min bei 30°C , 5-mal 11 min bei 25°C mit Detergenz und 4-mal 11 min bei 25°C ohne Detergenz) mit TBS-Puffer, der 2 mM DTT enthielt, unterzogen. Zur Elution des immobilisierten Spleißproduktes wurden die Beads 1 h in $100 \mu\text{L}$ 100 mM Biotin-Lösung inkubiert und mit dem Überstand gemäß Kapitel 9.4.5.1 *E. coli* TG1-Zellen ($\text{OD}_{600} \approx 0,5$; 30 min; 37°C) infiziert. Mit der Bildung neuer Phagenpartikel durch die Wirtszellen nach Superinfektion mit dem Helferphagen endete ein Biopanningschritt.

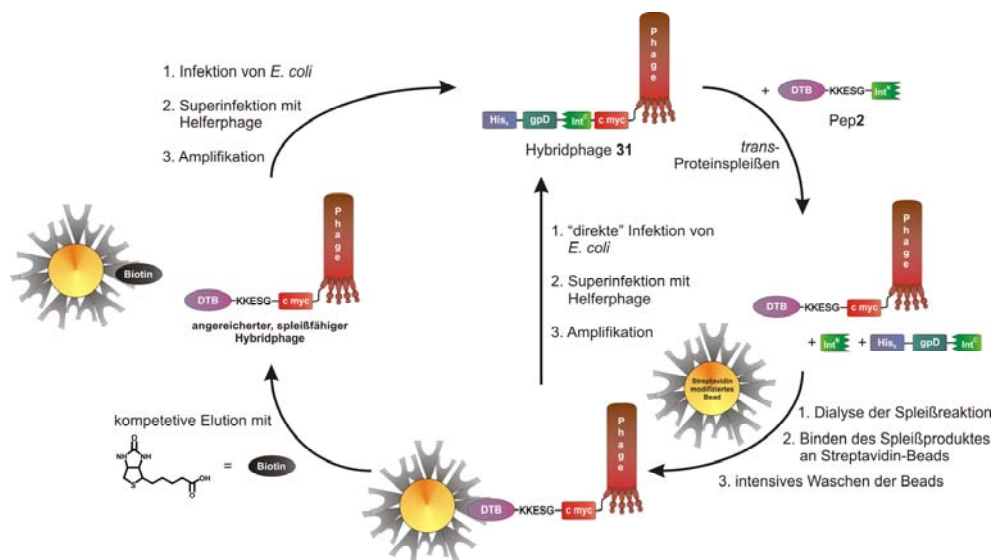


Abbildung 71. Schematische Darstellung eines Biopanningschrittes mit Phage 31 (DnaB^C (12-154)) und Pep2 (DTB-DnaB^N (1-11)). Nach dem *trans*-Proteinspleißen wird das Spleißprodukt über das Desthiobiotin von Pep2 (DTB-DnaB^N (1-11)) an den Beads immobilisiert. Es folgen intensive Waschschrte und anschließend wird der angereicherte Hybridphage entweder direkt mit Bakterienzellen inkubiert oder selektiv mit Biotin von den Beads eluiert (DTB: Desthiobiotin, gpD: Hüllprotein des λ -Phagen).

9.5. Analytische Methoden

Zusätzlich zu den in Kapitel 4.5 genannten analytischen Methoden mit HPLC und MALDI-TOF-MS sei noch ein Verfahren erläutert, dass es ohne großen Aufwand ermöglicht Proteine massenspektrometrisch zu untersuchen. Eine solche Methode ist der Verdau von Proteinen in SDS-Polyacrylamidgelen durch Endoproteinasen [331], um kurze Peptidfragmente zu erhalten, die mittels MALDI-TOF-MS analysiert werden können.

9.5.1. Der tryptische Verdau von Proteinen in SDS-Gelen

Im Rahmen dieser Arbeit wurde für den enzymatischen Verdau der ausgewählten Proteinbanden Trypsin verwendet, das nach den basischen Aminosäuren Arg und Lys (sofern kein Pro folgt) die Peptidbindung spaltet [332]. Wobei man sich zu Nutze macht, dass die Proteine bereits gemäß ihrer Masse in einem SDS-Gel getrennt und durch Anfärbung mit Coomassie sichtbar gemacht wurden.

Die möglichst genau ausgeschnittene Proteinbande wurde zum Enfärben 30 min bei 37°C in 200 µL Waschlösung (200 mM NH_4HCO_3 in 50% (v/v) Acetonitril, pH 9,2) inkubiert. Anschließend wurde die Waschlösung im Ölpumpenvakuum restlos entfernt und das Gelstück je nach Größe 1h mit 8 bis 15 µL Trypsin-Lösung (0,02 µg/µl Trypsin, 40 mM NH_4HCO_3 , 10% (v/v) Acetonitril, pH 8,1) inkubiert. Wobei nach 45 min evtl. weitere 5 µL Trypsin-Lösung hinzugefügt wurden. Die überstehende Lösung wurde entfernt und das Gelstück mit der aufgesogenen Trypsin-Lösung 16 bis 18 h bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die gebildeten Fragmente durch 45-minütige Inkubation mit 15 µL Diffusionslösung (10% (v/v) Acetonitril, 1% (v/v) TFA) im Ultraschallbad bei Raumtemperatur extrahiert und daraufhin mit MALDI-TOF massenspektrometrisch untersucht. Durch Vergleich mit den berechneten Peptidmassen [333] war es möglich, die Fragmente zu identifizieren.

10. Ergebnisse zur Proteinevolution des *Ssp* DnaB-Inteins mittels Phagen-Display (Projekt 2)

Inteine sind Proteine, die die Verbindung der sie in der Polypeptidkette flankierenden Proteine und/oder Peptide (N- und C-Extein) über eine native Peptidbindung katalysieren. Während dieses als Proteinspleißen bezeichneten Prozesses wird das Intein als Succinimid-Derivat aus der Polypeptidkette entfernt. Sobald das Intein in zwei unabhängige Fragmente gespalten ist, wird der Vorgang aus Assoziation der Inteinteile und die anschließende Spleißreaktion als *trans*-Proteinspleißen bezeichnet.

Im Rahmen der vorliegenden Doktorarbeit sollte ein auf dem Phagen-Display basierender Assay entwickelt werden, der in späteren Arbeiten die Verbesserung des *trans*-Proteinspleißens des künstlich gespaltenen *Ssp* DnaB-Inteins ermögliche. Aus der Literatur sind zwei Spaltstellen des *Ssp* DnaB-Intein bekannt [306, 307], die bei *in vitro*-Experimenten Spleißaktivität gezeigt haben. Zum einen kann das DnaB-Intein an der Position der Endonuklease-Domäne (Aminosäure 104) gespalten werden und die zweite Spaltposition befindet sich mit Aminosäure 11 sehr nah am N-Terminus.

Der Ergebnisteil des Projektes 2 untergliedert sich in drei Blöcke: Erstens die Etablierung des Spleißens auf der Phagenoberfläche und dessen Einsatz in Phagen-Display-Experimenten mit dem an Position 104 gespaltenen Intein, zweitens dasselbe mit dem an Position 11 gespaltenen Intein und drittens die Analyse des Einflusses der Aminosäure an Position +2 auf die Spleißreaktion.

10.1. *Trans*-Proteinspleißen des Phagen-präsentierten DnaB^C (107-154)

Um das *trans*-Proteinspleißen des DnaB^C (107-154)-Fragmentes zu verbessern sollte im Phagen-Display-Experiment der Phagenpartikel als Spleißprodukt mit an Streptavidin modifizierten Beads immobilisiertem DnaB^N (1-104)-Fragment ebenfalls an die Beads gebunden werden (Abbildung 72). Zum Zweck der Immobilisierung mit Streptavidin wurde das N-Extein MBP mit Biotin modifiziert. Nach Absolvierung verschiedener Waschschrte konnten *E. coli*-Zellen entweder direkt mit den Beads gebundenen, selektierten Phagen infiziert werden oder es wurde der Überstand eines tryptischen Verdaus der Phagenpartikel verwendet.

Als Vorexperiment zu dem in Abbildung 72 dargestellten Anreicherungszyklus wurde die Spleißreaktion in Lösung mittels Coomassie gefärbten SDS-Gelen bzw. Western-Blots untersucht. Die Spleißaktivität des N-terminalen Inteinfragments wurde sowohl mit einem aufgereinigten Protein als auch mit Hybridphagen analysiert.

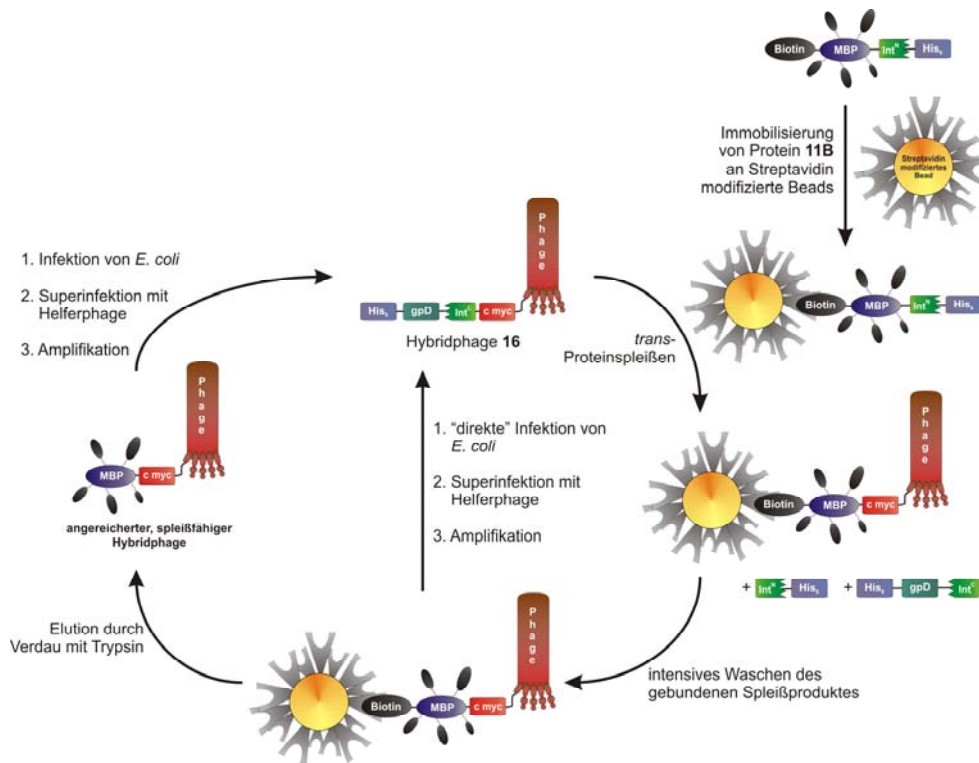


Abbildung 72. Schema des „trans-Proteinspleißens an fester Phase“. Das Fusionsprotein mit dem Int^N-Fragment **11B** (DnaB^N (1-104)) wird durch Modifikation mit Biotin an Streptavidin immobilisiert. Als Spleißpartner wird die Fusion aus dem Phagepartikel und dem DnaB^C (107-154) **16** hinzugegeben. Das entstandene Spleißprodukt kann nach verschiedenen Waschschritten entweder Bakterienzellen direkt infizieren oder wird vorher durch einen tryptischen Verdau von den Beads abgelöst und anschließend jene Lösung zur Infektion benutzt.

10.1.1. Spleißen des Phagen-präsentierten DnaB^C (107-154) mit Protein 11 (DnaB^N (1-104))

Durch Expression des Phagemid-Plasmids, das einen Teil des Hybridphagen **9** (StrepII-gpD-DnaB^C (107-154)-c myc-ΔpIII) kodiert, in einem Bakterienstamm, der das zwischen der c myc-Epitopsequenz und dem verkürzten pIII-Hüllprotein lokalisierte Amber-Stop-Kodon (TAG) nicht supprimiert, wurde das Protein **10** (StrepII-gpD-DnaB^C (107-154)-c myc) ohne pIII translatiert. Der Spleißpartner war Protein **11** (MBP-DnaB^N (1-104)-His₆; kurz: DnaB^N (1-104)) (Abbildung 73).

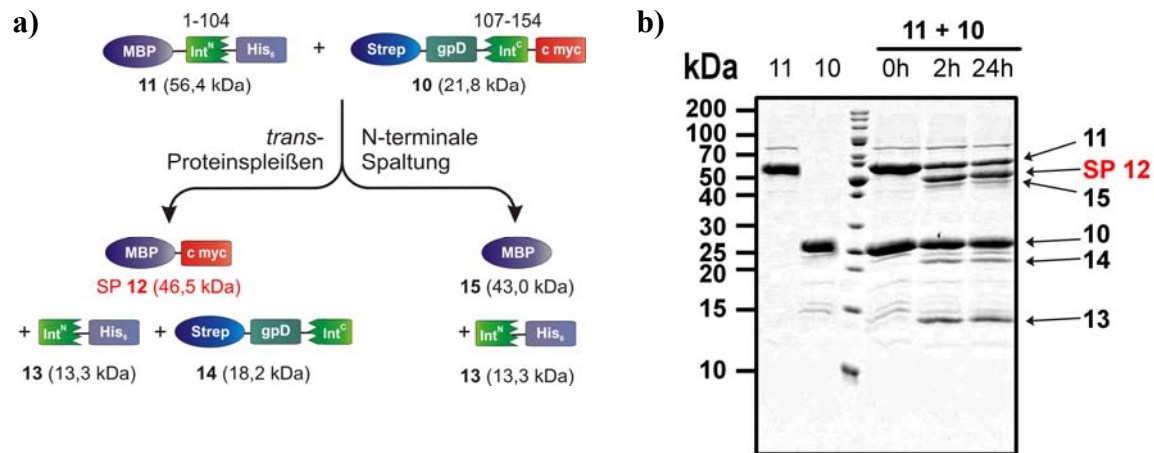


Abbildung 73. Auswertung der Spleißreaktion zwischen Protein 11 (DnaB^N (1-104)) und 10 (StrepII-gpD-DnaB^C (107-154)-c myc). a) Schematische Darstellung der Spleißreaktion. b) Coomassie gefärbtes SDS-Gel der Spleißreaktion (beide Spleißpartner je 15 µM). Neben den Proben nach 0, 2 und 24 h Reaktionsdauer wurden auch die beiden Proteine als Kontrolle einzeln aufgetragen.

Abbildung 73 zeigt die Auswertung der Spleißreaktion zwischen den beiden rekombinanten Proteinen **11** (DnaB^N (1-104)) und **10** (StrepII-gpD-DnaB^C (107-154)-c myc), das als Fusionsprotein mit dem verkürzten Hüllprotein ΔpIII auch Bestandteil des Phagen **9** ist, durch ein Coomassie gefärbtes SDS-Gel. Nach 2 h ist neben dem gebildeten Spleißprodukt **12** (MBP-c myc) auch das Produkt der N-terminalen Spaltung **15** (MBP) detektierbar. Bezogen auf das Fusionsprotein mit Int^N-Fragment (**11**) sind nach 24 h ca. 50% in Spleißprodukt und 16% in das Produkt der N-terminalen Spaltung umgewandelt worden. Da die Reaktion ausschließlich mit aufgereinigten Proteinen ablief, ist die MBP-Bande nur durch N-terminale Spaltung erklärbar und kann nicht von endogenem MBP aus *E. coli* selbst stammen. Ein evtl. vorhandenes Produkt der C-terminalen Spaltung kann aufgrund seiner Größe von 3,5 kDa nicht detektiert werden.

Im nächsten Schritt sollte die Spleißaktivität zwischen Protein **11** und dem entsprechenden Hybridphagen **9** in Lösung untersucht werden. Aufgrund der geringen Konzentration eines Reaktanden (Konzentration der Hybridphagen in der Regel 20 bis 40 nM) und möglichen Produkten wurde von einer Detektion mit einem Coomassie gefärbten SDS-Gel abgesehen und die sensitivere, immunologische Nachweismethode des Western-Blots genutzt. Im ersten Western-Blot wurde ein Antikörper gegen den c myc-Tag, der C-terminal zum DnaB^C (107-154) auf der Phagenoberfläche präsentiert wurde, verwendet (Abbildung 74). Zusätzlich zu dem Phagen **9** (StrepII-gpD-DnaB^C (107-154)-c myc-ΔpIII) wurde der Phage **16** (His₆-gpD-DnaB^C (107-154)-c myc-ΔpIII; kurz: DnaB^C (107-154)), ein Derivat in dem der StrepII- durch einen His₆-Tag ersetzt worden war, auf Spleißaktivität getestet (Abbildung 74).

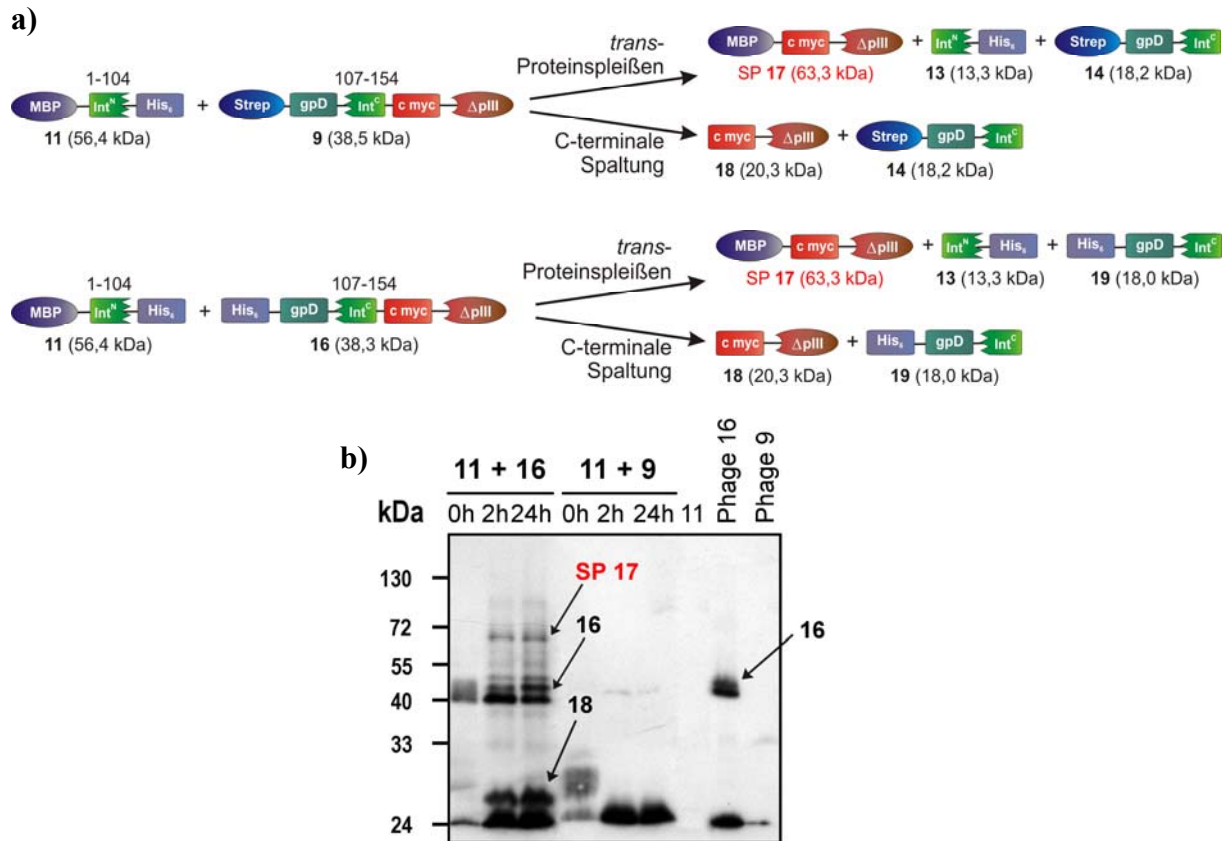


Abbildung 74. Western-Blot (anti-c myc) der Spleißreaktionen verschiedener auf dem Phagen präsentierter DnaB^C (107-154)-Fusionsproteine. a) Schematische Darstellung der Spleißreaktion zwischen Protein 11 (DnaB^N (1-104)) und Phage 9 bzw. 16 (DnaB^C (107-154)). b) Im Western-Blot ist die Spleißreaktion vor Beginn des Experimentes und nach 2 und 24 h gezeigt. Außerdem wurden als Kontrolle das Protein 11 (DnaB^N (1-104)) und die Phagen alleine aufgetragen.

Der Western-Blot zeigt deutlich den Einfluss unterschiedlicher N-terminaler Affinitätstags auf die Bildung des Hybridphagen. So scheint der Austausch des StrepII- gegen einen His₆-Tag die Produktion an intakten und nicht degradierten Hybridphagenpartikeln sehr zu begünstigen. Dies ist schon an den Kontrollspuren, die ausschließlich Phagenpartikel aufweisen, ablesbar, da im Falle des N-terminalen StrepII-Tag keine oder nicht detektierbare Mengen an Hybridphage 9 gebildet werden. Im Falle der Spleißreaktion zwischen Protein 11 (DnaB^N (1-104)) und Phage 16 (DnaB^C (107-154)) ist nach 2 h bei 25°C erstmalig ein starker Hinweis gegeben, dass *trans*-Proteinspleißen auf der Oberfläche eines Hybridphagen möglich sei, da nach 2 und 24 h eine der Größe des Spleißproduktes entsprechende Bande detektiert wurde (gekennzeichnet mit SP 17). Außerdem konnte im Rahmen des Western-Blots (Abbildung 74) auch das Nebenprodukt der C-terminalen Spaltung 18 (c myc-ΔpIII) beobachtet werden, dass im Vergleich zum möglichen Spleißprodukt 20-mal stärker gebildet wurde. Aufgrund der Ausbeuten an gebildeten Hybridphagen wurde für die nachfolgenden Experimente ausschließlich der Phage 16 (DnaB^C (107-154)) mit dem N-terminalen His₆-Tag verwendet.

Zur eindeutigen Identifizierung des Spleißproduktes waren weitere Experimente notwendig. Hierbei sollte der Anteil des zweiten Spleißpartners im Produkt der Reaktion ebenfalls nachgewiesen werden. Neben dem Anteil des Hybridphagen sollte das Spleißprodukt mit Hilfe eines anti-MBP-Antikörpers durch einen Western-Blot detektierbar sein. Das Ergebnis ist in Abbildung 75 gezeigt.

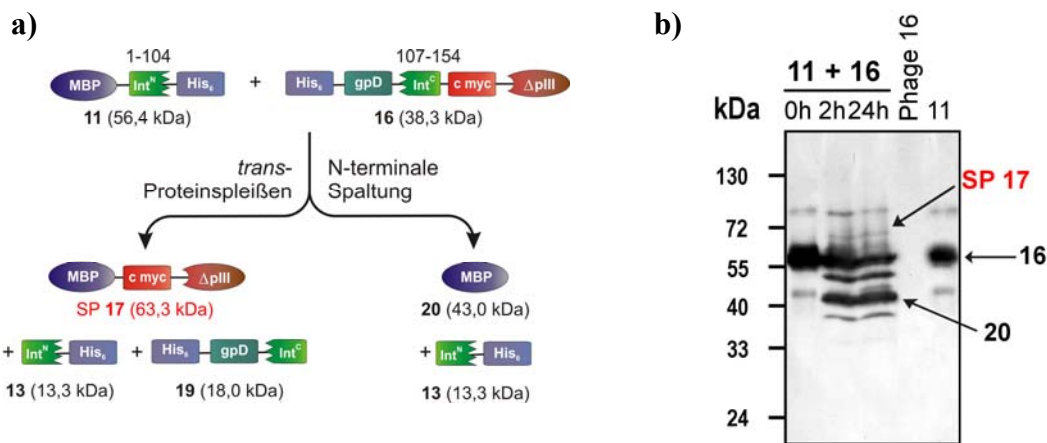


Abbildung 75. Western-Blot (anti-MBP) der Spleißreaktion zwischen Protein 11 (DnaB^N (1-104)) und Phage 16 (DnaB^C (107-154)). a) Schematische Darstellung der Spleißreaktion. b) Sowohl Proben vor dem Experiment als auch nach 2 und 24 h Inkubation bei 25°C wurden aufgetragen. Die Kontrollen bildeten die alleinige Auftragung des Protein 11 (DnaB^N (1-104)) und des Phagen 16 (DnaB^C (107-154)).

Da auch bei dieser Analyse (Abbildung 75) nach 2 und 24 h Reaktionszeit eine Bande unterhalb der 72 kDa-Marke auftrat (gekennzeichnet mit **SP 17**), untermauerte dies die Tatsache, dass Proteinspleißen stattfand. Auch in diesem Spleißansatz überwog das Produkt der Nebenreaktion, der N-terminalen Spaltung, **20** das potentielle Spleißprodukt **17** um das 7-fache. Daher kann in Kombination mit dem Western-Blot aus Abbildung 74 festgestellt werden, dass lediglich 5% des eingesetzten Hybridphagen in Spleißprodukt, der Hauptanteil jedoch in die Produkte der Nebenreaktionen umgesetzt wird.

Zur weiteren Bestätigung des potentiellen Spleißproduktes wurde ein Vergleich eines spleißaktiven Inteins mit einer nicht spleißaktiven Mutante (Protein **21**) durchgeführt. Deshalb wurde in der DnaB^N-Hälfte des Proteins **11** (DnaB^N (1-104)) das Cys an Position 1 gegen ein Ala ausgetauscht (Protein **21**). Somit konnte nach Bildung des Spleißkomplexes mit dem Phagen **16** (DnaB^C (107-154)) ausschließlich C-terminale Spaltung erfolgen (Abbildung 76).

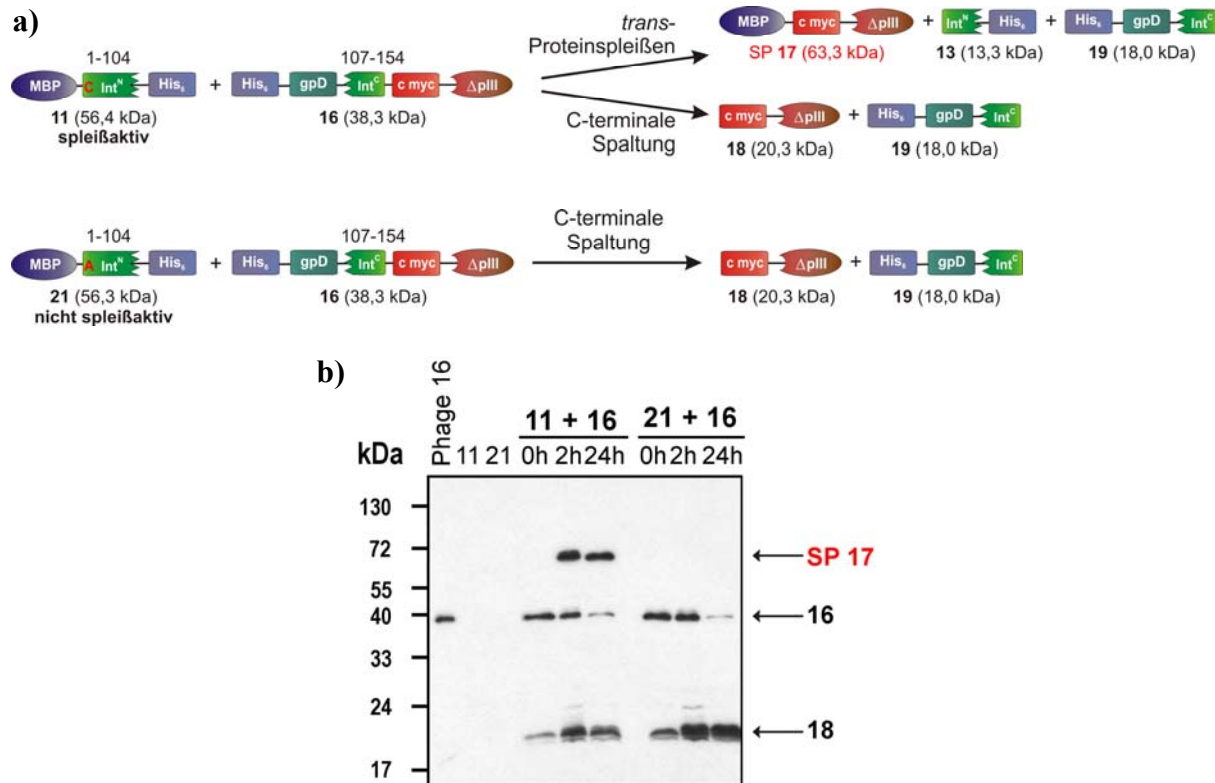


Abbildung 76. Western-Blot (anti-c myc) der Kontroll-Spleißreaktionen einer nicht spleißaktiven Version des DnaB^N (1-104). a) Schematische Darstellung der Spleißreaktionen zwischen Protein 11 (Cys1, DnaB^N (1-104)) bzw. 21 (Ala1, DnaB^N (1-104)) und Phage 16 (DnaB^C (107-154)). b) Von beiden Spleißansätzen sind im Western-Blot jeweils eine 0, 2 und 24 h-Probe aufgetragen. Die Kontrollen bilden die alleinigen Proben der beiden Proteine und des Hybridphagen.

Tatsächlich war nur in der Reaktion mit dem spleißaktiven DnaB^N-Fusionsprotein die Bande des potentiellen Spleißproduktes detektierbar (gekennzeichnet mit **SP 17**). Daher war der Beweis erbracht, dass *trans*-Proteinspleißen zwischen einem Phagen-präsentierten DnaB^C (107-154)-Fragment und einem rekombinanten Protein mit dem DnaB^N (1-104)-Fragment möglich ist. Die C1A-Mutante zeigte erwartungsgemäß nur die Bildung des Produktes der C-terminalen Spaltung. Die Addition der Bandenintensität von Spleißprodukt und Produkt der C-terminalen Spaltung beim Ansatz mit Protein 11 (Cys1, DnaB^N (1-104)) entspricht in etwa der Intensität des Produktes der C-terminalen Spaltung beim Ansatz mit Protein 21 (Ala1, DnaB^N (1-104)). Im Gegensatz zu Abbildung 74 ist das Verhältnis zwischen Spleißprodukt und Produkt der C-terminalen Spaltung in Abbildung 76 zu Gunsten des Spleißproduktes **17** verschoben. Eine Erklärung dafür könnte die in diesem Experiment mit ca. 50 nM doppelt so hohe Konzentration an Hybridphage 16 (DnaB^C (107-154)) sein, die eine Assoziation der beiden DnaB-Fragmente begünstigte.

Daraufhin sollte ein Western-Blot mit einem Antikörper gegen das Hüllprotein pIII nachweisen, dass der eingesetzte Hybridphage 16 (DnaB^C (107-154)) und damit auch das Spleißprodukt **17** vollständig synthetisiert wurde (Abbildung 77).

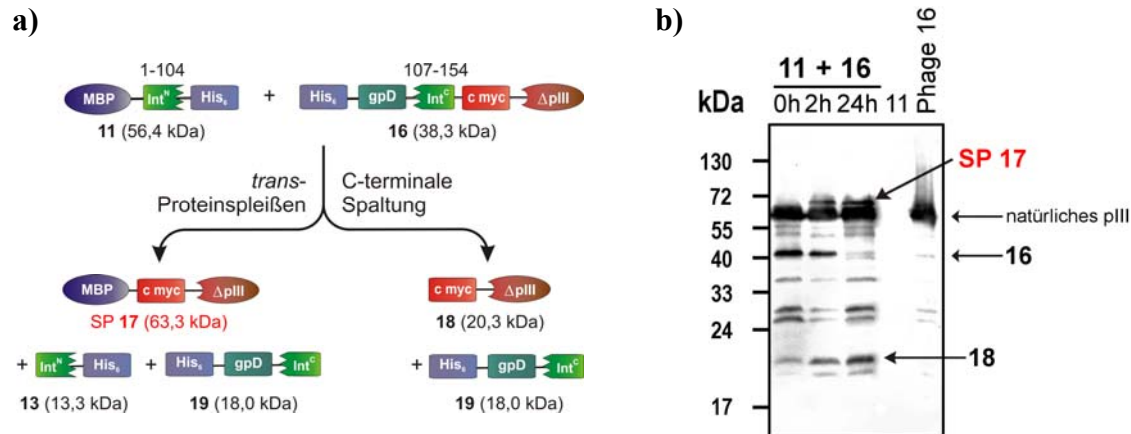


Abbildung 77. Western-Blot (anti-pIII) der Spleißreaktion zwischen Protein 11 (DnaB^N (1-104)) und Phage 16 (DnaB^C (107-154)). a) Schematische Darstellung der Spleißreaktion. b) Sowohl Protein 11 als auch der Phage 16 sowie die Proben der Spleißreaktion nach 0, 2 und 24 h sind aufgetragen. Neben den markierten Banden sind auf dem Western-Blot diverse Proteolyse-Produkte und Signale von Proteinen mit nicht supprimiertem TAG-Stop-Kodon zu sehen. Sowohl in der Kontrolle (Phage 16) als auch in den Proben der Spleißreaktion kann das natürliche Phagenhüllprotein pIII (42,6 kDa, zum Laufverhalten in SDS-Gelen siehe unten) nachgewiesen werden.

Die Vielzahl der im Western-Blot auftretenden Banden ist durch die folgenden Tatsachen zu erklären. Zum einen kommt es während der Expression und Aufreinigung des Hybridphagen zu proteolytischem Abbau, zum anderen werden auch in supprimierenden *E. coli*-Stämmen ca. 20% des translatierten Proteins durch das Amber-Stop-Kodon, das zwischen c myc-Tag und Hüllprotein pIII lokalisiert ist, terminiert. Trotz dieser Schwierigkeiten ist die Kernaussage des Western-Blots der Nachweis eines vom N- zum C-Terminus intakten Spleißproduktes 17 (MBP-c myc-ΔpIII). Außerdem konnte auch das Produkt der C-terminalen Spaltung 18 (c myc-ΔpIII) erneut detektiert werden. Hinsichtlich des natürlichen pIII-Hüllproteins wird angenommen, dass die beiden Serin/Glycin-reichen Verbindungssequenzen zwischen den Domänen des pIII, dessen Laufverhalten in SDS-Gelen so beeinflussen, dass es bei weit höheren Massen detektiert wird, als es eigentlich besitzt [334].

Als letzter Schritt vor dem Beginn der Proteinevolutions-Experimente musste der Einfluss der für die Anreicherungszyklen (Abbildung 72) essentiellen Biotinmodifikation des Proteins 11 (Protein 11B) auf die *trans*-Proteinspleißaktivität untersucht werden (Abbildung 78). Das chemisch modifizierte Protein 11B ging aus 11 (DnaB^N (1-104)) durch Umsetzung mit dem Natriumsalz des Biotin-X-NHS-Esters (Sulfosuccinimidyl-6-[biotin-amido]natriumhexanoat) hervor. Hierdurch wurden je nach Konzentration des Proteins bzw. des NHS-Esters unterschiedlich viele primäre Aminogruppen über eine sechs Kohlenstoffatome umfassende aliphatische Kette mit Biotin modifiziert.

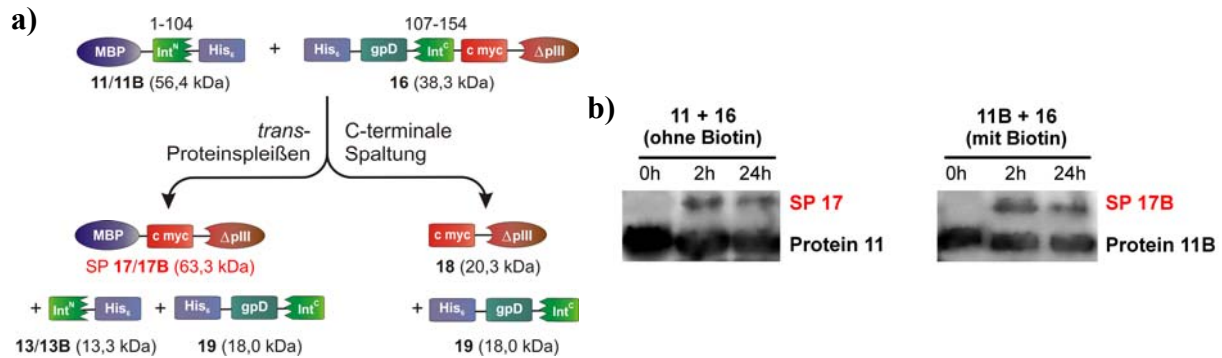


Abbildung 78. Vergleich der Western-Blots (anti-MBP) der Spleißreaktionen zwischen Protein 11 (DnaB^N (1-104)) bzw. 11B und Phage 16 (DnaB^C (107-154)). a) Schematische Darstellung der Spleißreaktion. b) Vergleich der Western-Blots der Spleißansätze zur Bestimmung des Einflusses der Biotinmodifikation auf die Ausbeute an Spleißprodukt 17 bzw. 17B.

Aus dem in Abbildung 78 dargestellten Ausschnitt der anti-MBP Western-Blots können zwei wichtige Aussagen abgeleitet werden. Die Biotinmodifikation scheint sowohl keinen nachteiligen Einfluss auf die Ausbeute der Spleißreaktion, als auch auf die Epitop-Detektion des monoklonalen Antikörpers zu haben. Somit konnten spleißaktive Hybridphagen 16 (DnaB^C (107-154)) entwickelt werden, die mit dem Biotin modifizierten Protein 11B (DnaB^N (1-104)) in Anreicherungszyklen zur Verbesserung der Inteineigenschaften eingesetzt werden können.

10.1.2. Die Anreicherung des Hybridphagens (DnaB^C (107-154)) (Teil 1)

Um die Durchführbarkeit des entwickelten Experimentzyklus oder Biopanning-Schrittes nachzuweisen, sollte in einem ersten Ansatz ein spleißaktiver Hybridphage aus einer Mischung mit einem im Überschuss vorhandenen nicht spleißaktiven Kontrollphagen über mehrere Runden hinweg angereichert werden. Das System aus Phage 16 (DnaB^C (107-154)) und Protein 11B (DnaB^N (1-104)) wurde gemäß den in Abbildung 72 beschriebenen Biopanningschritten genutzt. Dabei sollte das nach dem Spleißen an der festen Phase gebildete Spleißprodukt durch mehrere Waschschriffe von unspezifisch bindenden Phagen befreit werden. Danach musste die Rückgewinnung spleißaktiver Phagenpartikel erfolgen, die einen Schlüsselschritt für eine erfolgreiche „Proteinevolution“ besonders im Bezug auf die Verarmung von DNA-Bibliotheken an Sequenzvielfalt darstellt. Für die Amplifikation der angereicherten Phagen konnten zwei Vorgehensweisen gewählt werden. Zum einen konnten die über Biotin an den Streptavidin modifizierten Beads immobilisierten Phagenpartikel direkt mit *E. coli*-Zellen inkubiert werden. Zum anderen konnte die Infektion der *E. coli*-Zellen mit Phagenpartikeln erfolgen, die über einen kurzzeitigen Verdau mit der Protease Trypsin von

den Beads abgelöst worden waren. Deshalb wurde in einem weiteren Vorexperiment die bessere Elutions- und Infektionsmethode bestimmt (Abbildung 79). In dem Vorexperiment wurden nach einer Spleißreaktion zwischen Phage **16** (DnaB^C (107-154)) und dem Protein **11B** (DnaB^N (1-104)) und den Waschschritten die Beads halbiert. Mit der einen Hälfte wurden *E. coli* TG1-Zellen direkt infiziert, die andere Hälfte wurde vor der Infektion 30 min bei 37°C mit der Protease Trypsin inkubiert und dadurch die an Streptavidin als Spleißprodukt immobilisierten Phagenpartikel von den Beads abgelöst.

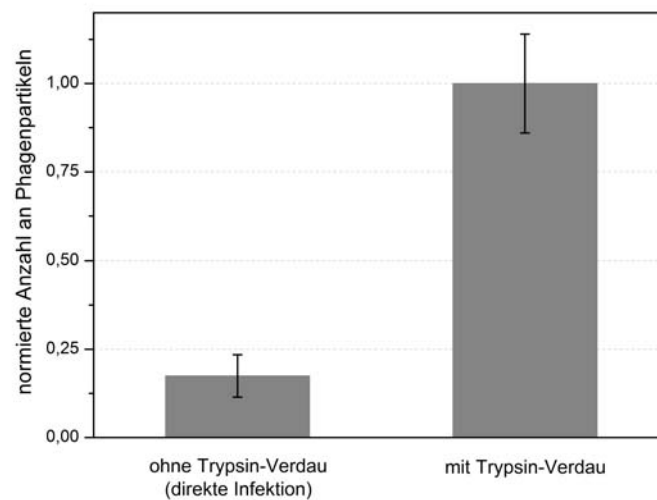


Abbildung 79. Vergleich der direkten Infektion von *E. coli*-Zellen mit der Infektion nach Ablösung der Phagenpartikel durch tryptischen Verdau. Aufgetragen ist die normierte Anzahl an eluierten, infektiösen Partikeln des Phagen **16** (DnaB^C (107-154)) aus drei unabhängigen Experimenten. Die Normierung erfolgte auf die höchste gemessene Phagen-Konzentration in cfu/mL.

Abbildung 79 zeigt, dass die Anzahl infizierter Bakterienzellen bei direkter Infektion weniger als 20% betrug, verglichen mit der Anzahl an Zellen, die durch die mittels Trypsin-Verdau abgelösten Phagen infiziert werden konnten. Daher wurde vor der Infektion der *E. coli*-Zellen jeweils ein Trypsin-Verdau durchgeführt.

Im ersten Anreicherungs experiment, das sich über 7 Runden erstreckte, wurde der spleiß-aktive Phage **16** (DnaB^C (107-154)) im Verhältnis 1:10000 mit dem nicht spleißaktiven Kontrollphagen **22**, dessen Fusionsprotein lediglich aus einer kurzen Aminosäure-Sequenz, dem c myc-Tag und dem pIII bestand, gemischt. Die Mischung erfolgte gemäß der Phagenkonzentration, die sich durch Messung der optischen Dichte bei 270 nm berechnen ließ.

Um das Verhältnis zwischen dem spleißaktiven Phagen **16** (DnaB^C (107-154)) und dem nicht spleißaktiven Kontrollphagen **22** zu bestimmen, wurden aus zufällig ausgewählten, infizierten *E. coli*-Kolonien nach dem 7. Biopanningzyklus die entsprechenden Phagemidplasmide präpariert. Eine Behandlung der Plasmide mit der Restriktionsendonuklease *Hind*III ergab zwei

unterschiedliche Verdauemuster, die auf einem Agarosegel sichtbar gemacht wurden (Abbildung 80).

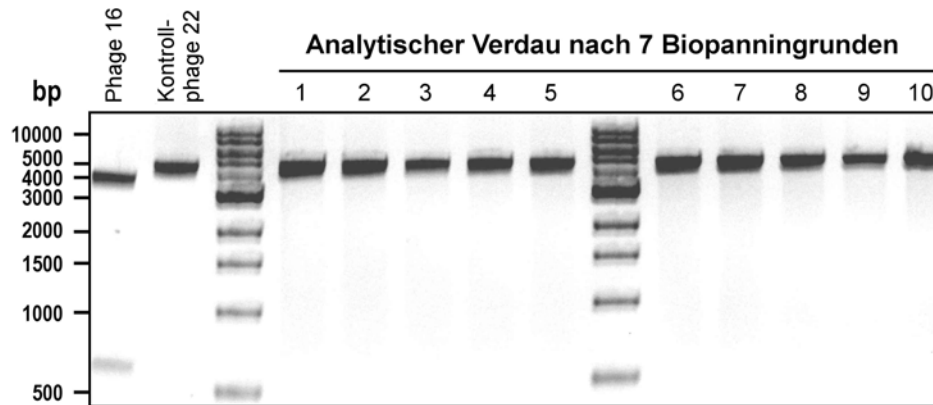


Abbildung 80. Darstellung eines Agarose-Geles des analytischen *Hind*III-Verdaus von Phagemidplasmiden aus zehn zufällig ausgewählten Kolonien. In Abhängigkeit des präparierten Plasmides entstanden unterschiedliche Verdauemuster. Im Falle des spleißaktiven Phagen **16** (DnaB^C (107-154)), der angereichert werden sollte, 627 und 3476 bp. Der nicht spleißaktive Kontrollphage **22** ergab nur eine Bande bei 4328 bp.

In Abbildung 80 ist exemplarisch der Verdau von 10 Kolonien gezeigt. Allerdings wurden von den ca. 200 Kolonien auf der Agar-Platte insgesamt 50 untersucht und in keiner wurde das zu Phage **16** (DnaB^C (107-154)) gehörige Phagemidplasmid gefunden. Da auch eine erneute Durchführung von 5 Biopanning-Schritten kein verbessertes Ergebnis erbrachte, musste geklärt werden, warum so eine große Anzahl an nicht spleißaktiven Phagen während des Experimentes nicht im notwendigen Maß abgereichert wurde.

Umfassende Experimente führten zu der Annahme, dass hierfür die Ablösung unspezifisch an die Beads oder die Plastikoberfläche des Reaktionsgefäßes bindender Phagenpartikel während der Elution mit Trypsin verantwortlich wäre. Zur Lösung dieses Problems waren zwei Änderungen des angewandten Protokolls denkbar. Zum einen mussten die Beads besser geblockt und gewaschen werden, um unspezifische Wechselwirkungen mit den Phagen zurückzudrängen. Zum anderen musste durch eine spezifische Elution des immobilisierten Spleißproduktes das Ablösen unspezifisch gebundener Phagenpartikel auf ein Minimum beschränkt werden.

10.1.3. Spleißen des Phagen-präsentierten DnaB^C (107-154) mit Protein 24 (SBP-DnaB^N (1-104))

Die sehr starke Bindung von gelöstem Biotin an das immobilisierte Streptavidin der Beads ($1 \cdot 10^{-15}$ M) sollte genutzt werden, um das Spleißprodukt kompetitiv von den Beads zu eluieren. Deshalb wurde Protein **11** (DnaB^N (1-104)) N-terminal um das Streptavidin-bindende Protein (SBP) [320], das aus 38 Aminosäuren besteht und einen K_d -Wert von 2,5 nM aufweist, verlängert. Hierdurch wurde aus Protein **11** (DnaB^N (1-104)) das Konstrukt **24** (SBP-MBP-DnaB^N (1-104)-His₆; kurz: SBP-DnaB^N (1-104)).

Daraus ergab sich folgender neuer Ablauf eines Biopanningschrittes (Abbildung 81). Nach der Immobilisierung von Protein **24** (SBP-DnaB^N (1-104)) inkubierte man die Beads mit dem Phagen **16** (DnaB^C (107-154)). Auf verschiedene Waschschrte folgte neben der direkten Infektion als neue Möglichkeit die spezifische Elution der Spleißprodukte mit Biotin.

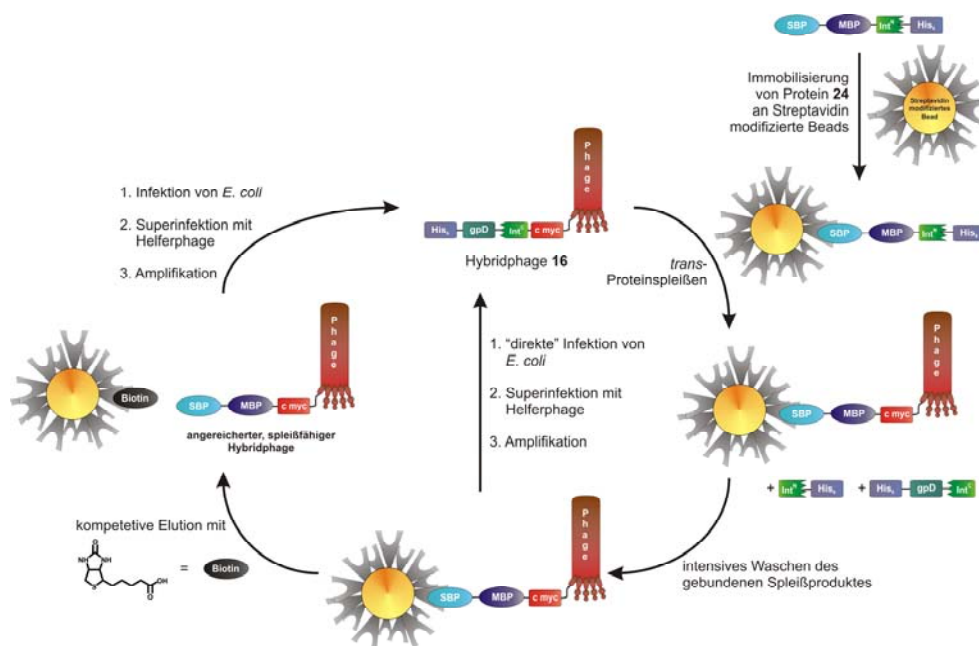


Abbildung 81. Schema des „trans-Proteinspleißens an fester Phase“. Das Fusionsprotein mit dem Int^N-Fragment **24** (SBP-DnaB^N (1-104)) wird an Streptavidin modifizierte Beads immobilisiert. Als Spleißpartner wird der das DnaB^C (107-154) präsentierende Hybridphage **16** hinzugegeben. Das entstandene Spleißprodukt kann nach verschiedenen Waschschrten entweder Bakterienzellen direkt infizieren oder wird mit Biotin spezifisch von den Beads eluiert und anschließend das Eluat zur Infektion benutzt.

Voraussetzung für das erfolgreiche Absolvieren eines Biopanningschrittes (Abbildung 81) ist das Spleißen auf der Phagenoberfläche in Lösung. In einem ersten Spleißansatz wurde das Protein **24** (SBP-DnaB^N (1-104)) mit dem aufgereinigten Protein **25** (StrepII-gpD-DnaB^C (107-154)-His₆; kurz: StrepII-DnaB^C (107-154)) inkubiert (Abbildung 82).

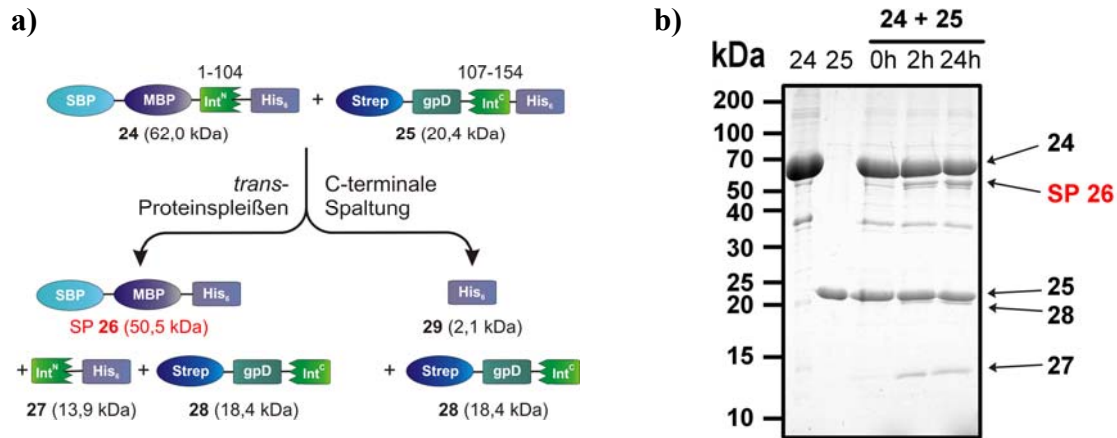


Abbildung 82. Coomassie gefärbtes SDS-Gel der Spleißreaktion zwischen Protein 24 (SBP-DnaB^N (1-104)) und 25 (StrepII-DnaB^C (107-154)). a) Schematische Darstellung der Spleißreaktion. b) Neben den Einzelproben der Proteine 24 und 25 sind auch die 0, 2 und 24 h Probe der Spleißreaktion auf dem SDS-Gel aufgetragen. Die Konzentration des Protein 25 (StrepII-DnaB^C (107-154)) betrug 10 μ M, das Protein 24 (SBP-DnaB^N (1-104)) wurde mit 20 μ M eingesetzt.

Abbildung 82 zeigt das Coomassie gefärbte SDS-Gel dieser Spleißreaktion. In Anbetracht der vergleichsweise hohen Konzentrationen der Spleißpartner überrascht die Bildung von nur 11% Spleißprodukt 26 (SBP-MBP-His₆) nach 24 h Inkubation bei 25°C. Trotz des geringen Umsatzes konnte Protein 24 (SBP-DnaB^N (1-104)) als funktional angenommen werden und konnte mit dem Phagen 16 (DnaB^C (107-154)) umgesetzt werden. Das C-terminale Spaltprodukt 29 war mit 2,1 kDa zu klein für die Porenweite des verwendeten SDS-Gels und konnte daher nicht detektiert werden.

Die Spleißreaktion zwischen Phage 16 (DnaB^C (107-154)) und Protein 24 (SBP-DnaB^N (1-104)) wurde mit den Ausbeuten eines Ansatzes mit den Spleißpartnern 16 (DnaB^C (107-154)) und 11 (DnaB^N (1-104)) verglichen (Abbildung 83). Hiermit sollte untersucht werden, ob die Vergrößerung des N-Exteins einen Einfluss auf die Spleißreaktion ausübe.

Aus beiden Western-Blots von Abbildung 83 geht hervor, dass der Phage 16 (DnaB^C (107-154)) mit Protein 24 (SBP-DnaB^N (1-104)) spleißaktiv ist. Außerdem deutet ein Vergleich der beiden gebildeten Spleißprodukte auf eine ähnliche Aktivität des Phagen-präsentierten DnaB^C-Fragmentes in Reaktionen mit sowohl Protein 11 (DnaB^N (1-104)) als auch Protein 24 (SBP-DnaB^N (1-104)) hin.

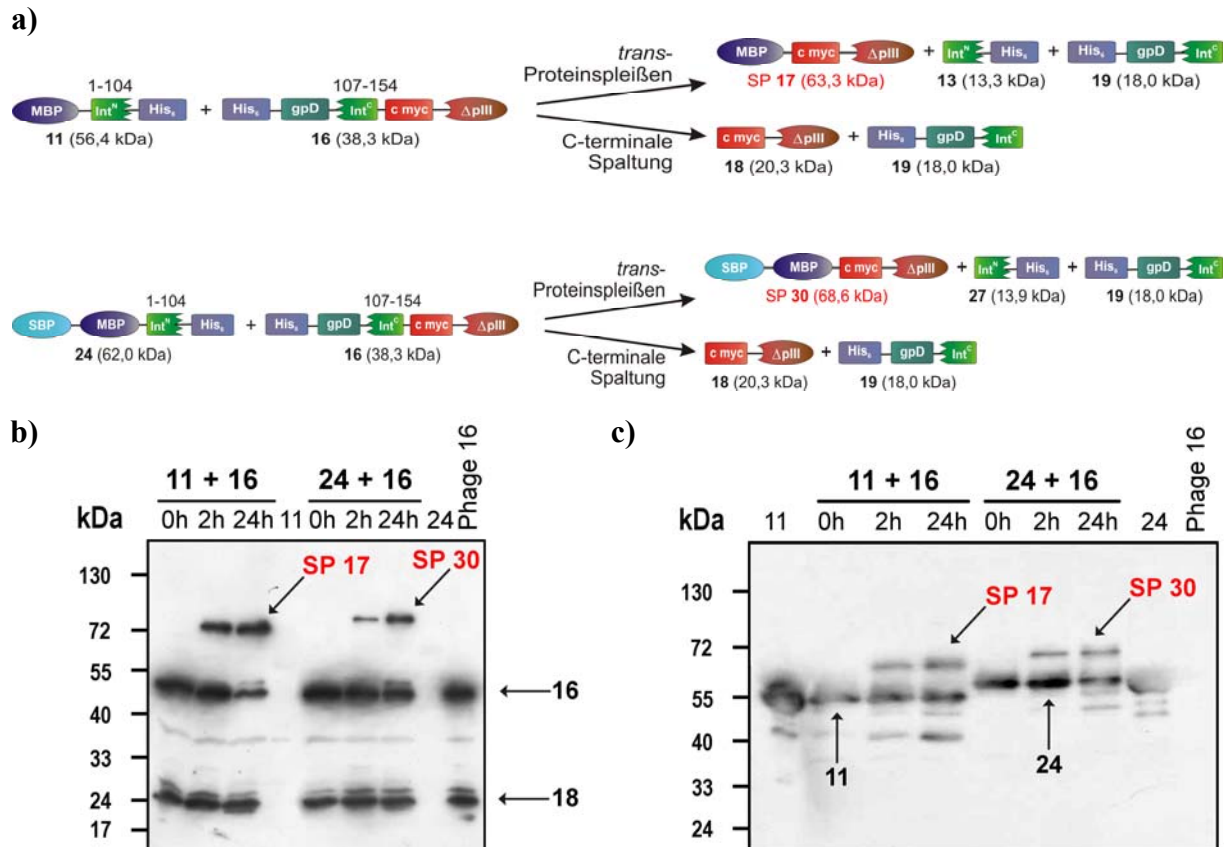


Abbildung 83. Vergleich der Ausbeuten der Spleißreaktion zwischen Protein 11 (DnaB^N (1-104)) bzw. seinem Derivat 24 (SBP-DnaB^N (1-104)) und Phage 16 (DnaB^C (107-154)). a) Schematische Darstellung der Spleißreaktionen. b) Western-Blot mit anti-c myc-Antikörper. c) Western-Blot mit anti-MBP-Antikörper. Im Falle beider Western-Blots waren zur Kontrolle der Phage 16 und die Proteine 11 und 24 alleine aufgetragen worden. Außerdem sind die 0, 2 und 24 h Probe der jeweiligen Spleißreaktion aufgetragen worden.

In einem weiteren Western-Blot mit dem anti-MBP-Antikörper wurde die Verdrängung des Spleißproduktes mit Biotin von den Beads analysiert. Im Gegensatz zu den bisher gezeigten Western-Blots, wurde in jenem Spleißansatz zuerst das Protein **24** (SBP-DnaB^N (1-104)) durch Bindung an das Streptavidin auf den Beads immobilisiert und anschließend der Phage **16** (DnaB^C (107-154)) hinzugegeben. Jene Vorgehensweise war notwendig damit nicht un-reagiertes Protein **24** (SBP-DnaB^N (1-104)) des Spleißansatzes während der Immobilisierung eine Mehrzahl der Bindestellen besetze bevor das sterisch anspruchsvolle Spleißprodukt **30** (SBP-MBP-c myc-ΔpIII) andockt habe. Zwar kann dieses Problem durch eine Erhöhung des Beadvolumens gelöst werden, doch ist bei der späteren Proteinevolution ohnehin mit einem höheren Materialaufwand zu rechnen, damit die Komplexität der Mutantenbibliothek nicht unnötig geschmälert wird. Nach 24 h-Reaktionszeit wurden die Beads auf unterschiedliche Weise eluiert. Zur Elution wurde eine 100 mM Biotin-Lösung, eine 4 M Magnesiumchloridlösung, eine Glycin/Salzsäure-Lösung (pH = 2,2) sowie das Aufkochen eines Teiles der Beads in 4x SDS-Probenpuffer eingesetzt.

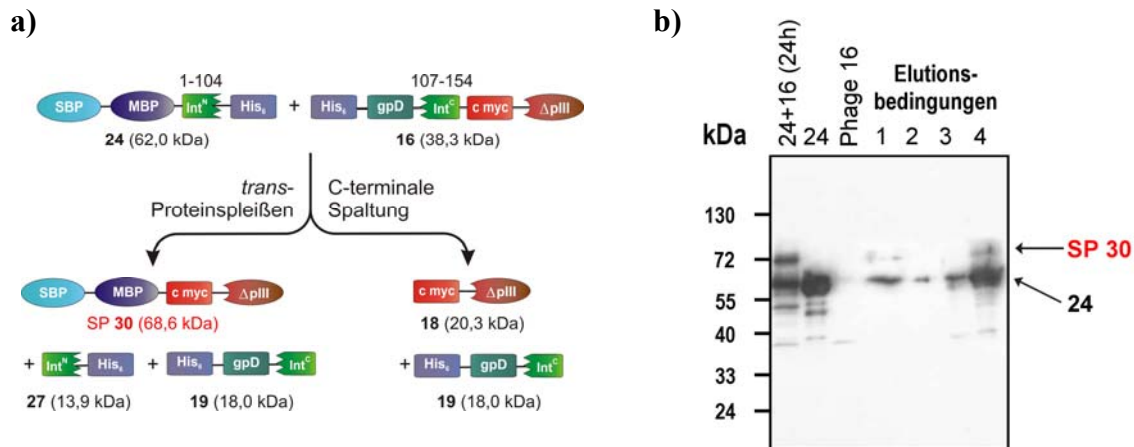


Abbildung 84. Analyse der Elution des auf den Beads immobilisierten Spleißproduktes 30 via Western-Blot (anti-MBP). a) Schematische Darstellung der Spleißreaktion. b) Western-Blot mit anti-MBP. Zur Kontrolle wurden Protein 24 (SBP-DnaB^N (1-104)) sowie Phage 16 (DnaB^C (107-154)) alleine und die 24 h Probe eines Spleißanstzes von 24 und 16 in Lösung aufgetragen (Elutionsbedingungen: 100 mM Biotin-Lösung (1), 4 M Magnesiumchloridlösung (2), Glycin/Salzsäure-Lösung (pH = 2,2) (3) und Aufkochen der Beads in 4x SDS-Probenpuffer (4)).

Die Bahn der aufgekochten Beads (4) in Abbildung 84 zeigt an, dass es während der Inkubation mit dem Phagen 16 (DnaB^C (107-154)) zur Bildung von Spleißprodukt gekommen war. Dies belegt ein Vergleich mit der 24-stündigen Spleißreaktion ohne Bindung an die Beads (linke Spur in Abbildung 84b)). Bei Einsatz der Biotin-Lösung ist neben dem Protein 24 (SBP-DnaB^N (1-104)) auch eine geringe Menge des Spleißproduktes 30 eluiert worden. Die Schwäche der Banden-Intensitäten kann mit mehreren Faktoren erklärt werden. Erstens war die Spleißreaktion durch die eingeschränkte Bewegungsfreiheit des immobilisierten Proteins 24 (SBP-DnaB^N (1-104)) einerseits und die Größe des Phagen 16 (DnaB^C (107-154)) andererseits sterisch sehr anspruchsvoll. Zweitens blieben durch die Aufteilung des Spleißansatzes auf mehrere Experimente nur wenige Beads übrig und drittens bewirkte die Elution eine Verringerung der Konzentration von Protein 24 und Spleißprodukt 30 durch Verdünnung. Trotz allem zeigen die Ergebnisse, dass die Reaktion des Phagen 16 (DnaB^C (107-154)) mit dem Protein 24 (SBP-DnaB^N (1-104)) zu Spleißprodukt 30 führte. Weiterhin kann über das SBP eine Immobilisierung an die Beads erfolgen sowie durch Zugabe von Biotin die Bindung zum Streptavidin aufgelöst werden.

10.1.4. Optimierung der Bedingungen für Spleißen mit DnaB^C (107-154)

Bevor ein weiteres Anreicherungs experiment mit dem Phagen 16 (DnaB^C (107-154)) durchgeführt werden konnte, mussten zwei Punkte optimiert werden. Zum einen bestand die Not-

wendigkeit die richtigen Bedingungen für das Blocken der Beads festzustellen, zum anderen musste der Anteil an nicht beadsgebundenem Protein **24** (SBP-DnaB^N (1-104)) auf ein Minimum beschränkt werden.

Die Untersuchungen auf die besten Blockbedingungen mussten auch bezüglich der späteren Elution des Spleißproduktes durch Biotin durchgeführt werden. Als Ergebnis resultierte die nachstehende Vorgehensweise: Vor Immobilisierung des Proteins **24** (SBP-DnaB^N (1-104)) werden die Beads über Nacht mit einem Puffer, der 3% BSA und 0,05% Tween 20 enthält, geblockt und nach der Bindung noch einmal mit 0,05% Tween 20.

Durch Umsetzung des an die Beads gebundenen Proteins **24** (SBP-DnaB^N (1-104)) mit **25** (StrepII-DnaB^C (107-154)) sollte ergründet werden, wie durch unterschiedliche Waschschritte die Spleißreaktion optimiert werden könne. Hierbei wurde besonderer Wert auf die Fragestellung gelegt, wie sichergestellt werden könne, dass ausschließlich an Streptavidin gebundener Spleißpartner den Hybridphagen zugeführt würde und somit die Spleißreaktion nicht mit dem Protein in Lösung stattfände. Deshalb wurde eine Verlängerung der Waschzyklen und eine Erhöhung der Temperatur von 25 auf 30°C während des Waschvorgangs durchgeführt (siehe Kapitel 9.4.5.1) und anschließend die Auswirkungen der Maßnahmen mit einem Western-Blot gegen das MBP analysiert (Abbildung 85).

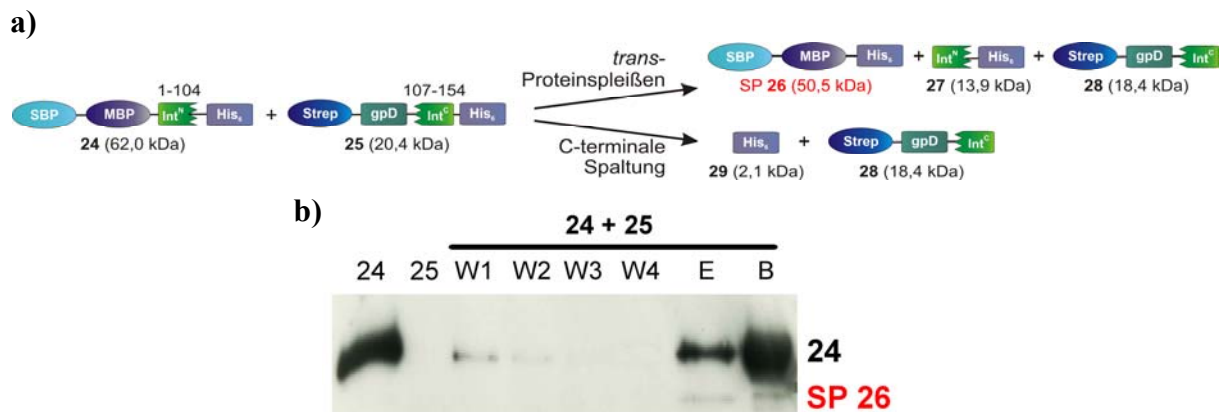


Abbildung 85. Analyse der stringenteren Waschbedingungen durch Western-Blot (anti-MBP). a) Schematische Darstellung der Spleißreaktion. b) Ausschnitt aus dem Western-Blot der Spleißreaktion von Protein **24** (SBP-DnaB^N (1-104)) und **25** (StrepII-DnaB^C (107-154)). Gezeigt ist die Analyse von vier Waschfraktionen (W1: Hälfte des ersten Waschzyklus; W2: letzter Waschschritt vor der Spleißreaktion; W3: letzter Waschschritt mit TBSTT-Puffer nach der Spleißreaktion; W4: letzter Waschschritt vor der Elution des Spleißproduktes), dem Eluat mit Biotinlösung (E) und der in 4x SDS-Probenpuffer aufgekochten Beads (B).

Die Fraktion W2 in Abbildung 85b) zeigt, dass der Anteil an frei in der Lösung vorliegendem Protein **24** (SBP-DnaB^N (1-104)) gegenüber Fraktion W1 verringert werden konnte, sodass das DnaB^C-Fragment in der nachfolgend ablaufenden Spleißreaktion vorwiegend mit immobilisiertem DnaB^N-Fragment assoziieren musste. Außerdem wurde in den Proben nach

Elution mit Biotin und dem Aufkochen der Beads in 4x SDS-Probenpuffer auch Spleißprodukt **26** (SBP-MBP-His₆) detektiert.

Abschließend sollte noch getestet werden, welche Elutionsdauer die besten Ergebnisse unter den Gesichtspunkten Ausbeute und Praktikabilität erziele. Als Resultat ergab sich, dass eine Inkubation mit Biotinlösung für 1 h das an Streptavidin gebundene Protein **24** (SBP-DnaB^N (1-104)) zu 50% ablösen kann. Lediglich die Inkubation der Beads über Nacht in Biotinlösung konnte die Elution weiter steigern, hätte aber den Zeitaufwand für einen Biopanningzyklus stark erhöht, was sich vermutlich negativ auf die Infektiosität der Phagen ausgewirkt hätte. Ob eine Elutionseffizienz von ca. 50% ausreichend wäre, sollten neue Anreicherungsexperimente zeigen. Darüber hinaus wurde angenommen, dass sich die neuen, stringenteren Waschbedingungen positiv auf den Verlauf des Phagen-Display-Experimentes auswirken sollten.

10.1.5. Die Anreicherung des Hybridphagen (DnaB^C (107-154)) (Teil 2)

Im Folgenden sollte die Anreicherung des spleißaktiven Hybridphagen **16** (DnaB^C (107-154)) gegenüber dem nicht spleißaktiven Kontrollphagen **22** unter den optimierten Biopanning-Bedingungen durchgeführt werden. Dabei sollten die Phagen dem in Abbildung 86 dargestellten Zyklus des *trans*-Proteinspleißens an der festen Phase unterworfen werden.

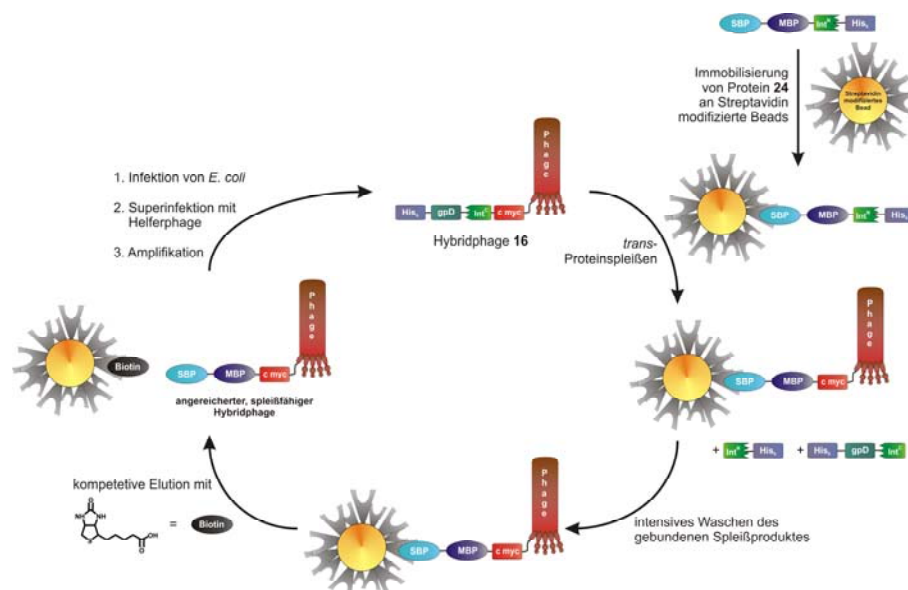
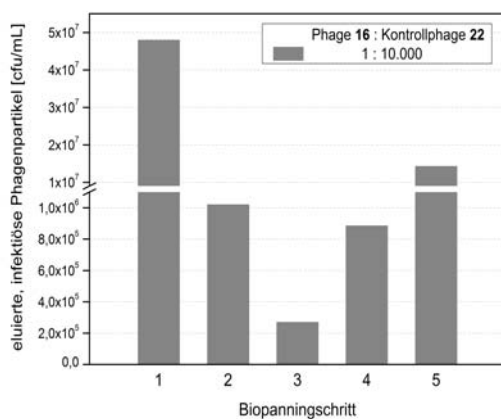


Abbildung 86. Schema des „*trans*-Proteinspleißens an fester Phase“. Das Fusionsprotein mit dem Int^N-Fragment **24** (SBP-DnaB^N (1-104)) wird an Streptavidin modifizierte Beads immobilisiert. Als Spleißpartner wird der das DnaB^C (107-154) präsentierende Hybridphage **16** hinzugegeben. Das entstandene Spleißprodukt wird nach verschiedenen Waschschritten mit Biotin spezifisch von den Beads eluiert und anschließend das Eluat zur Infektion benutzt.

Unter Verwendung der im vorhergehenden Kapitel optimierten Bedingungen sollte der spleißaktive Hybridphage **16** (DnaB^C (107-154)) aus einer 1:10000 Mischung mit dem Kontrollphagen **22** über mehrere Biopanningschritte angereichert werden.

Deshalb wurde das immobilisierte Protein **24** (SBP-DnaB^N (1-104)) mit der Phagenmischung inkubiert und das Spleißprodukt nach intensivem Waschen zur Entfernung von nicht reagiertem Edukt mit Biotin von den Streptavidin modifizierten, magnetischen Beads eluiert. Die Konzentration der eluierten Phagen wurde jeweils durch Testinfektion von Bakterienzellen mit anschließender Phagentiterung bestimmt (Abbildung 87).



	cfu/mL
Runde 1	$4,8 \cdot 10^7$
Runde 2	$1,0 \cdot 10^6$
Runde 3	$2,7 \cdot 10^5$
Runde 4	$8,9 \cdot 10^5$
Runde 5	$1,4 \cdot 10^7$

Abbildung 87. Darstellung der Konzentration der eluierten, infektiösen Phagen nach den einzelnen Biopanningschritten. Der spleißaktive Phage **16** (DnaB^C (107-154)) sollte nach 5 Biopanningschritten gegenüber dem nicht spleißaktiven Kontrollphagen **22** aus einer 1:10000 Mischung angereichert werden.

Da der Titer der Hybridphagen nach einem Einbruch in der 2. und 3. Runde eine Erholung durch einen exponentiellen Anstieg in den Runden 4 und 5 zeigte, wurden die Erwartungen bezüglich des Verlaufs der Phagenkonzentration erfüllt. Daher wurden aus Kolonien vor dem ersten und nach dem fünften Biopanningschritt die Plasmide präpariert und anschließend ihre Identität durch Restriktionsverdau mit *Hind*III bestimmt (Abbildung 88).

Abbildung 88b) zeigt exemplarisch ein Agarosegel nach dem Verdau von 10 zufällig ausgewählten Kolonien nach dem 5. Biopanningschritt. Insgesamt wurden von den 125 Kolonien auf der Platte 32 untersucht. Wobei 4 Mal das Muster des Restriktionsverdaus des Phagemidplasmid des spleißaktiven Phagen **16** (DnaB^C (107-154)) identifiziert wurde. Daher war der Phage **16** um den Faktor 1250 auf 1:8 angereichert worden. Dies entsprach einer durchschnittlichen Anreicherung mit dem Faktor 4,1 pro Biopanningschritt.

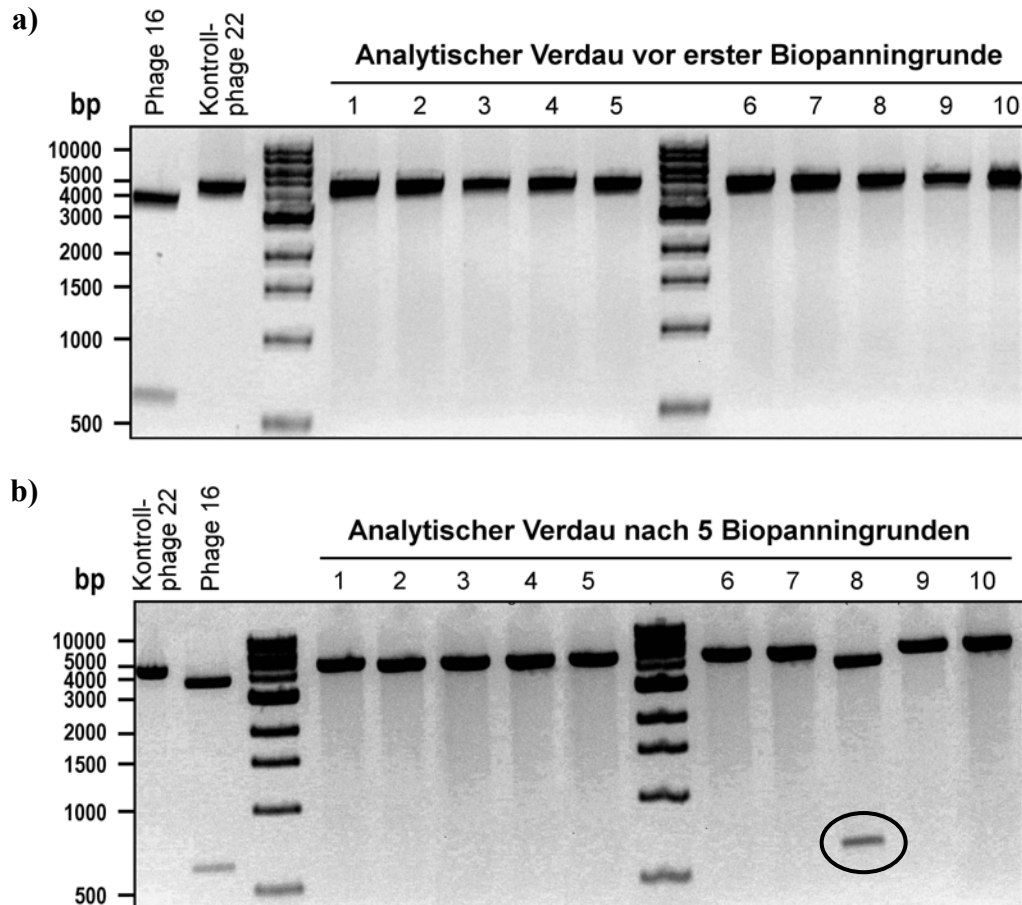


Abbildung 88. Exemplarische Darstellung von Agarose-Gelen der analytischen *Hind*III-Verdaue von Phagemidplasmiden, die aus zehn zufällig ausgewählten Kolonien präpariert wurden. In Abhängigkeit des präparierten Plasmides entstanden unterschiedliche Verdaumuster. Im Falle des Phagemidplasmides des spleißaktiven Phagen 16 (DnaB^C (107-154)) entstanden zwei Banden bei 627 und 3476 bp. Das Plasmid des nicht spleißaktiven Kontrollphagen 22 ergab im Verdaumuster nur eine Bande bei 4328 bp. Das Gel aus Teil a) zeigt die Situation vor dem Start der Anreicherung, im Teil b) sind 5 Biopanningrunden absolviert worden. In Probe 8 von Teil b) ist das Verdaumuster des Plasmides eines angereicherten, spleißaktiven Phagen markiert.

Für die Runden 4 und 5 der Abbildung 87 kann nun gefolgert werden, dass ein großer Teil des Anstiegs des Phagentiters auf die zunehmende Anreicherung des Hybridphagen 16 (DnaB^C (107-154)) zurückzuführen sei. Somit ist es mit dem optimierten, experimentellen Zyklus zum ersten Mal gelungen, einen spleißaktiven Hybridphagen aus einem Überschuss nicht spleißaktiver Phagen heraus anzureichern.

10.2. *Trans*-Proteinspleißen des Phagen-präsentierten DnaB^C (12-154)

Nachdem mit dem an Position 104 gespaltenen *Ssp* DnaB-Intein gezeigt worden war, dass Proteinspleißen auf der Phagenoberfläche und auch eine Anreicherung eines spleißfähigen

Hybridphagen möglich sei, sollte dies für das an Position 11 gesplattene Derivat übertragen werden.

Die Erkenntnisse, die aus der Arbeit mit dem DnaB^C (107-154)-präsentierenden Phagen gewonnen wurden, flossen in die Gestaltung des neuen Assays für *trans*-Proteinspleißen mit dem DnaB^C (12-154)-Fragment ein (Abbildung 89). So sollte das N-Extein ebenfalls mit Biotin von den Streptavidin modifizierten, magnetischen Beads eluiert werden können. Deshalb wurde das synthetische Peptid, das u. a. das DnaB^N (1-11)-Fragment beinhaltete, am N-Terminus mit Desthiobiotin modifiziert. Desthiobiotin besitzt gegenüber Streptavidin eine um drei Größenordnungen schlechtere Bindungsaffinität ($1 \cdot 10^{-12}$ M, [335]) als Biotin. Weiterhin sollte die Spleißreaktion nun vollständig „in Lösung“ absolviert werden, um den Assoziationsprozess der beiden DnaB-Fragmente zu erleichtern. Dies führte auch zu der Notwendigkeit überschüssiges, unreaktiertes Peptid vor der Immobilisierung des Spleißproduktes an die Beads durch Dialyse möglichst weitgehend abzutrennen, um die Bindestellen am Streptavidin nicht unnötig zu verringern. Nach den Waschschritten konnte das Spleißprodukt entweder direkt Bakterien infizieren oder vor der Infektion mit Hilfe von Biotin kompetitiv von den Beads eluiert werden.

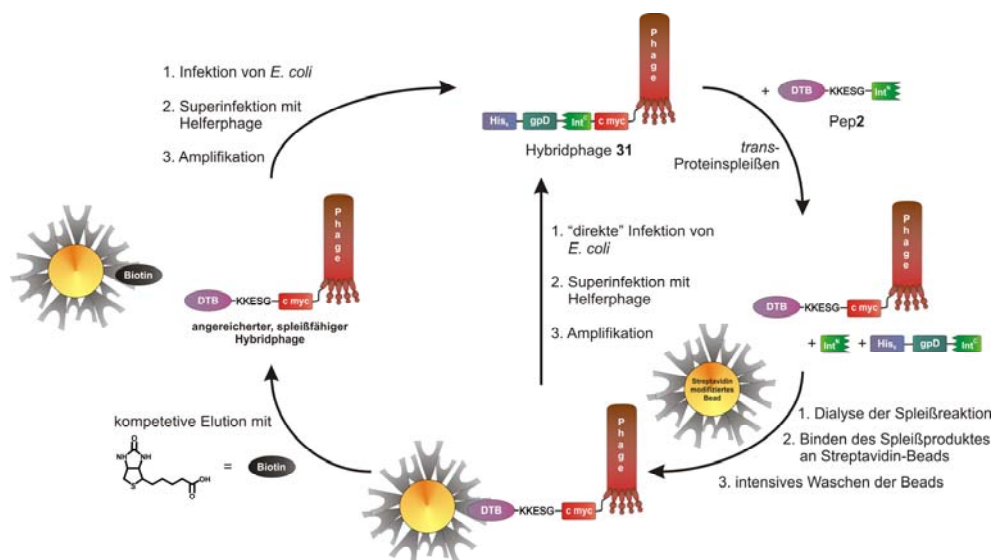


Abbildung 89. Schematische Darstellung des „*trans*-Proteinspleißens in Lösung“. Nach dem *trans*-Proteinspleißen von Pep2 (DTB-DnaB^N (1-11)) mit Phage 31 (DnaB^C (12-154)) wird die Reaktionslösung dialysiert und anschließend das Spleißprodukt über das Desthiobiotin an den Beads immobilisiert. An die intensiven Waschschriffe schließt sich an, dass der angereicherte Hybridphage entweder direkt mit Bakterienzellen inkubiert oder selektiv mit Biotin von den Beads eluiert wird (DTB: Desthiobiotin, gpD: Hüllprotein des λ -Phagen).

10.2.1. Spleißen des Phagen-präsentierten DnaB^C (12-154) mit Pep2 (DTB-DnaB^N (1-11))

Auch im Falle des an Position 11 gespaltenen DnaB-Inteins wurde vor dem Einsatz des Hybridphagen **31** (His₆-gpD-DnaB^C (12-154, C50S)-c myc-ΔpIII; kurz: DnaB^C (12-154)) erst der Spleißpartner Pep2 (Desthiobiotin-KKESG-DnaB^N (1-11); kurz: DTB-DnaB^N (1-11)) mit dem exprimierten und aufgereinigten Protein **32** (DnaB^C (12-154)-Trx-His₆; kurz: DnaB^C (12-154)-Trx) umgesetzt. Der Spleißansatz wurde über ein Coomassie gefärbtes SDS-Gel analysiert (Abbildung 90).

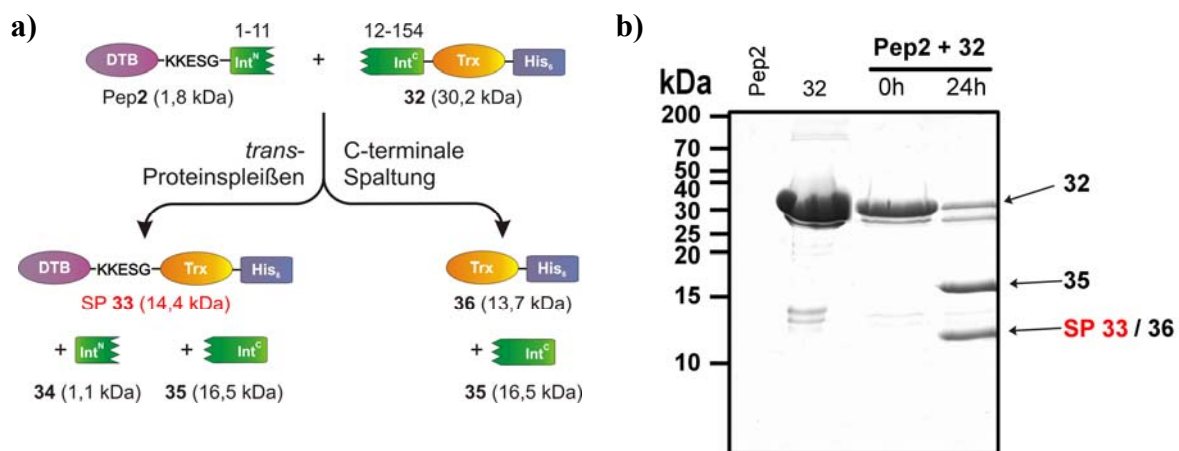


Abbildung 90. Coomassie gefärbtes SDS-Gel der Spleißreaktion zwischen Pep2 (DTB-DnaB^N (1-11)) und Protein 32 (DnaB^C (12-154)-Trx). a) Schematische Darstellung der Spleißreaktion. b) Auf dem SDS-Gel sind neben den Kontrollen von Pep2 und Protein 32 auch die Proben des Spleißansatzes nach 0 bzw. 24 h aufgetragen. Beide Spleißpartner wurden äquimolar mit einer Konzentration von 20 μM eingesetzt.

Aufgrund der ähnlichen Größe von Spleißprodukt **33** (DTB-Trx-His₆) und dem Produkt der C-terminalen Spaltung **36** (Trx-His₆) kann zwischen diesen schlecht unterschieden werden und daher die Bande bei ca. 14 kDa keinem von beiden eindeutig zugeordnet werden (Abbildung 90). Nach 24 h sind daher 77% des Proteins **32** vermutlich in eine Mischung aus Spleißprodukt und dem Produkt der C-terminalen Spaltung umgewandelt worden. N-terminale Spaltung konnte aufgrund der Größe des zu bildenden Produktes von weniger als 1 kDa nicht detektiert werden.

Da aus dem SDS-Gel nicht abgeleitet werden kann, ob ausschließlich das Spleißprodukt **33** oder das Produkt der C-terminalen Spaltung **36** entstanden ist oder die Bande beiden Produkten zugeordnet werden kann, müssen zur Lösung dieser Frage andere Verfahren benutzt werden. So kann die Bande tryptisch verdaut und anschließend massenspektrometrisch hinsichtlich entstandener Produktfragmente analysiert werden. Andererseits kann mittels Western-Blot gegen das Desthiobiotin ausschließlich das Spleißprodukt detektiert werden.

Da im Massenspektrum des tryptischen Verdaus dieser Bande sowohl das Fragment der Verbindungsposition der beiden Exteine (ESG|SIEGSGGGSDK (|: Verbindungsstelle der beiden Exteine); ber. 1266,544; gef. 1266,041 $[M+H]^+$) als auch das Fragment der ersten 11 Aminosäuren des Produktes der C-terminalen Spaltung (SIEGSGGGSDK; ber. 993,448; gef. 993,046 $[M+H]^+$) nachgewiesen wurden, ist von einer Überlagerung der jeweiligen Produktbanden auszugehen (Abbildung 91).

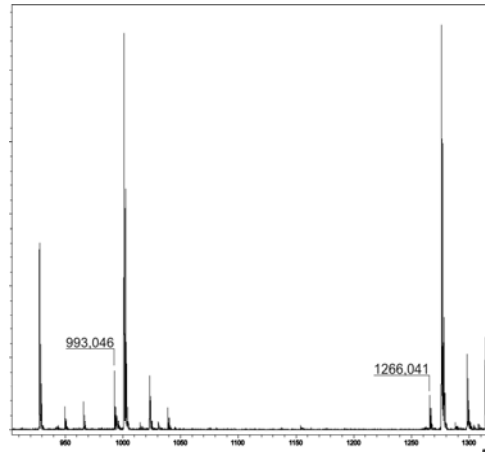


Abbildung 91. MALDI-MS-Analyse des tryptischen Verdaus der vermuteten Überlagerungsbande (Abbildung 90) von Spleißprodukt 33 und Spaltungsprodukt 36. Sowohl das charakteristische Fragment des Spleißproduktes (ESGSIEGSGGGSDK; ber. 1266,544; gef. 1266,041 $[M+H]^+$) als auch dasjenige des Produktes der C-terminalen Spaltung (SIEGSGGGSDK; ber. 993,448; gef. 993,046 $[M+H]^+$) konnte in der Proteinbande nachgewiesen werden.

Zur weiteren Klärung dieses Sachverhaltes und der Überprüfung, ob Spleißen mit dem Phagen **31** (DnaB^C (12-154)) möglich sei, wurden zwei Western-Blots durchgeführt. Der eine nutzte das Epitop des c myc-Tags, der andere verwendete die Bindung des Streptavidin/HRP-Konjugats an das Desthiobiotin (Abbildung 92).

Ein Vergleich der in Abbildung 92 dargestellten Western-Blots zeigt, dass das Spleißprodukt **37** und das Produkt der C-terminalen Spaltung **39**, wie bereits beim SDS-Gel aus Abbildung 90 vermutet, auf derselben Höhe laufen und sich daher gegenseitig überlagern. Dies wird besonders gut im Western-Blot gegen den c myc-Tag veranschaulicht, da unterhalb der 24 kDa-Marke nur eine Bande sichtbar ist. Außerdem ist bei der 24 h Probe eine deutliche Abnahme des Phagen präsentierten Proteins **31** (DnaB^C (12-154)) sichtbar.

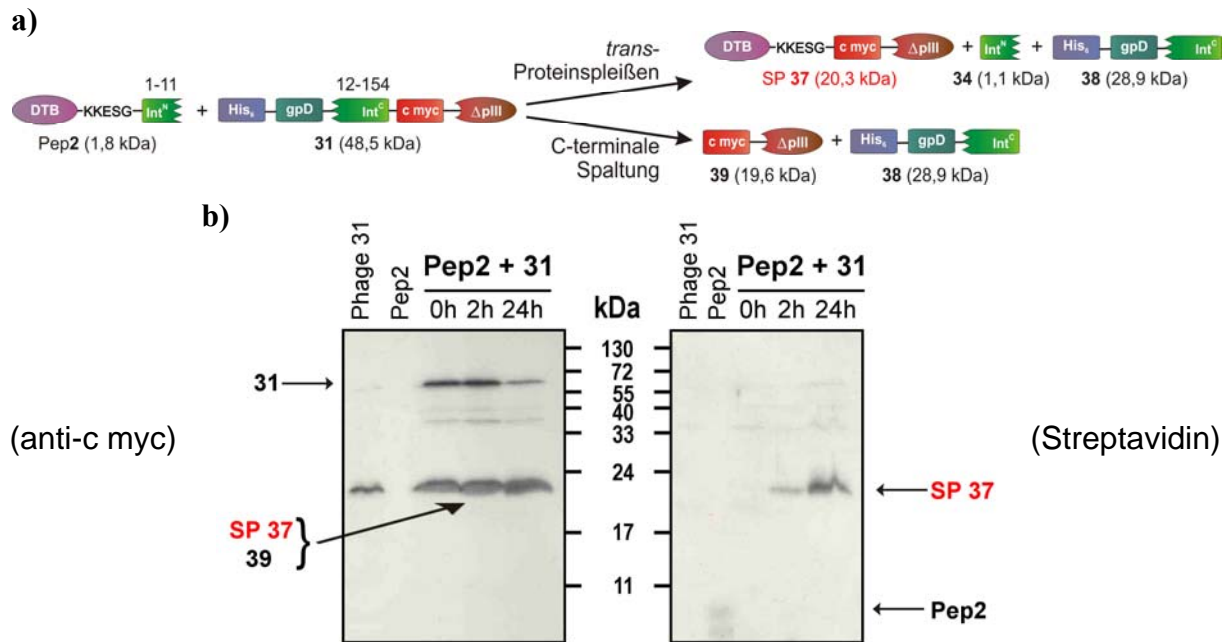


Abbildung 92. Vergleich der Western-Blots (anti-c myc (links) und Streptavidin/HRP-Konjugat (rechts)) der Spleißreaktion zwischen Pep2 (DTB-DnaB^N (1-11)) und Phage 31 (DnaB^C (12-154)). a) Schematische Darstellung der Spleißreaktion. b) In beiden Western-Blots sind je eine 0, 2 bzw. 24 h Probe der Spleißreaktion neben den Kontrollen (Pep2 bzw. Phage 31 alleine) aufgetragen worden.

Nachdem aus Abbildung 92 eindeutig hervorging, dass *trans*-Proteinspleißen zwischen Pep2 (DTB-DnaB^N (1-11)) und Phage 31 (DnaB^C (12-154)) in Lösung möglich sei, wurde im nächsten Schritt die Spleißreaktion mit Protein 32 (DnaB^C (12-154)-Trx) auf den Beads untersucht. Dabei wurde zum einen die Reaktion in Lösung durchgeführt und das Spleißprodukt anschließend auf den Beads immobilisiert. Zum anderen wurde das Pep2 (DTB-DnaB^N (1-11)) zunächst an Streptavidin gebunden und anschließend die Spleißreaktion an der festen Phase absolviert. In beiden Ansätzen sollte die Elution des Spleißproduktes mit einer 5 mM Biotin-Lösung erfolgen (Abbildung 93).

Beim Vergleich der Western-Blots (Abbildung 93) fällt auf, dass nach dem *trans*-Proteinspleißen in Lösung wesentlich mehr nachträglich immobilisiertes Spleißprodukt mit Biotin eluiert wurde als nach der Bildung des Spleißproduktes direkt an der festen Phase. Somit muss der Spleißvorgang in Lösung stattfinden und danach das Spleißprodukt an die Beads immobilisiert werden.

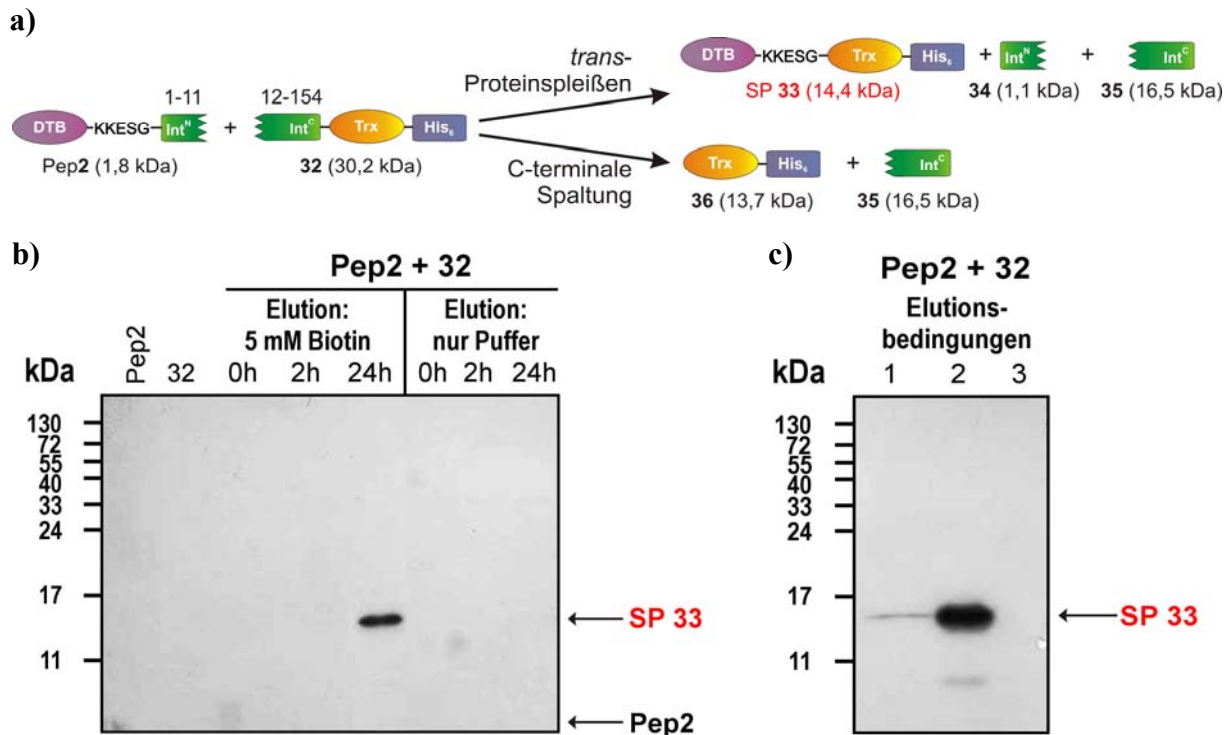


Abbildung 93. Vergleich der Spleißreaktion in Lösung mit derjenigen an der festen Phase hinsichtlich der Ausbeute sowie der Elution des immobilisierten Spleißproduktes durch Western-Blot (Streptavidin/HRP-Konjugat). a) Schematische Darstellung der Spleißreaktion. b) Bevor das Spleißprodukt **33** an den Beads immobilisiert wurde, fand die Reaktion zwischen den Partnern Pep2 (DTB-DnaB^N (1-11)) und Protein **32** (DnaB^C (12-154)-Trx) in Lösung statt. Hierbei wurde die Inkubation des Spleißansatzes mit den Beads nach unterschiedlichen Zeitspannen durchgeführt (sofort, 2 und 24 h). Anschließend wurde die Elution des immobilisierten Spleißproduktes mit 70 μ L 5 mM Biotinlösung bzw. 70 μ L TBS-Puffer geprüft. c) Die Spleißreaktion erfolgte zwischen dem auf den Beads immobilisierten Pep2 (DTB-DnaB^N (1-11)) und löslichem Protein **32** (DnaB^C (12-154)-Trx) für 24 h. Mit unterschiedlichen Bedingungen wurde die Elution des gebildeten Spleißproduktes getestet (Elutionsbedingungen: 25 μ L 5 mM Biotinlösung (1), Beads in 4x SDS-Probenpuffer aufgekocht (2) und 25 μ L TBS-Puffer (3)).

Bei dieser Vorgehensweise entsteht das Problem der Absättigung aller Streptavidin-Bindestellen durch das in großem Überschuss eingesetzte Pep2. Deshalb sollte untersucht werden, ob der überwiegende Teil des Pep2 (DTB-DnaB^N (1-11)) in einem Dialyseverfahren mit einer Dialysemembran mit sehr großer Porenweite abgetrennt werden könne (Abbildung 94). Um unspezifische Wechselwirkungen des Phagen **31** (DnaB^C (12-154)) und vor allem des Spleißproduktes **37** mit der Dialysemembran auf ein Minimum zu beschränken, wurde die Dialysemembran durch Inkubation in einer 3% BSA/0,05% Tween 20-Lösung über Nacht geblockt. Dem Western-Blot gegen den c myc-Tag (Abbildung 94) kann entnommen werden, dass das Spleißprodukt **37** entsteht und dass dieses auch nach der Dialyse genau wie das Phagenhybridprotein **31** (DnaB^C (12-154)) noch detektierbar ist. Zusätzlich konnte im Western-Blot mit dem Streptavidin/HRP-Konjugat auch in der Probe mit den aufgekochten Beads eindeutig sowohl immobilisiertes Pep2 (DTB-DnaB^N (1-11)) als auch Spleißprodukt **37** nachgewiesen

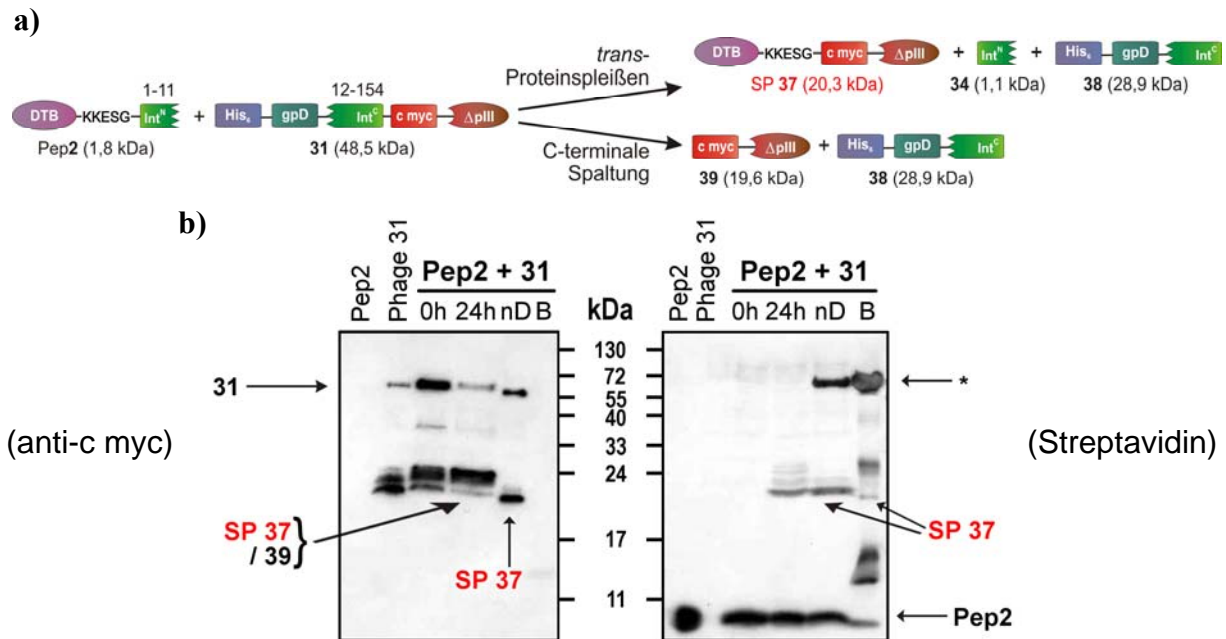


Abbildung 94. Kontrolle des Ablaufes eines Biopanningschrittes bis zur Immobilisierung auf den Beads mittels Western-Blot (anti-c myc (links) und Streptavidin/HRP-Konjugat (rechts)). a) Schematische Darstellung der Spleißreaktion. b) Nach der 24-stündigen Spleißreaktion von Pep2 (DTB-DnaB^N (1-11)) und Phage 31 (DnaB^C (12-154)) wurde der Ansatz dialysiert um die Konzentration des Peptids zu verringern. Schließlich wurde die dialysierte Lösung mit den Beads inkubiert, um das Spleißprodukt 37 an das Streptavidin zu binden (nD: Probe nach letztem Dialyseschritt; B: Beads in 4x SDS-Probenpuffer aufgekocht; *: unspezifisch detektiertes BSA aus dem Blockpuffer).

werden. Weiterhin zeigt die Spur nach der Dialyse, dass ca. 95% des in der Spleißreaktion eingesetzten und dort nicht reagierten Peptids zurückgewonnen wird. Ein Umstand der im nächsten Kapitel näher beleuchtet werden soll.

Die Ergebnisse der Western-Blots aus Abbildung 93 und 94 zeigen, dass eine Spleißreaktion von Pep2 (DTB-DnaB^N (1-11)) und Protein 32 (DnaB^C (12-154)-Trx) sowie Phage 31 (DnaB^C (12-154)) sowohl in Lösung als auch nach Immobilisierung von Pep2 auf den Beads möglich ist.

10.2.2. Untersuchungen zu unspezifischen Interaktionen des Pep2 (DTB-DnaB^N (1-11))

Eine Erklärung für die geringe Abtrennungseffizienz des Peptids während der Dialyse, könnten unspezifische Interaktionen der Phagenpartikel mit dem DnaB^N-Peptid (Pep2) sein. Da die Poren für die großen Phagenpartikel nicht passierbar sind, wird so auch das an die Phagen aggregierte Peptid zurückgehalten.

Zur Untersuchung auf unspezifische Wechselwirkungen zwischen Phagenhülle und Pep2 (DTB-DnaB^N (1-11)) und der anschließenden Elution des gebildeten Aggregates mit Biotin sollte folgendes Experiment durchgeführt werden. In vier Ansätzen wurde jeweils Phage **31** (DnaB^C (12-154)) und Kontrollphage **22** mit und ohne Pep2 (DTB-DnaB^N (1-11)) inkubiert. Nach 20 h-Reaktionszeit mit jeweils demselben Titer an Hybridphagen und anschließender Dialyse wurden die Spleißansätze für 1h mit geblockten Beads inkubiert. Auf den nochmals gegenüber Kapitel 10.1.4 verschärften Waschvorgang (3x kurz, 3x 17 min bei 25°C, 1x 45 min bei 30°C, 5x 11 min, 25°C mit Detergenz und 4x 11 min bei 25°C ohne Detergenz) folgte eine Drittelung der Ansätze. Das erste Drittel wurde für den ELISA der Beads vor Elution mit Biotin und das zweite Drittel für nach der Elution genutzt. Das Eluat des zweiten Drittels sowie das letzte Drittel wurden jeweils mit *E. coli*-Zellen inkubiert und die Phagenmenge in cfu/mL bestimmt.

Zunächst soll der ELISA, der Auskunft über die Elution unspezifisch mit dem Peptid interagierender Phagen von den Beads gibt, betrachtet werden (Abbildung 95).

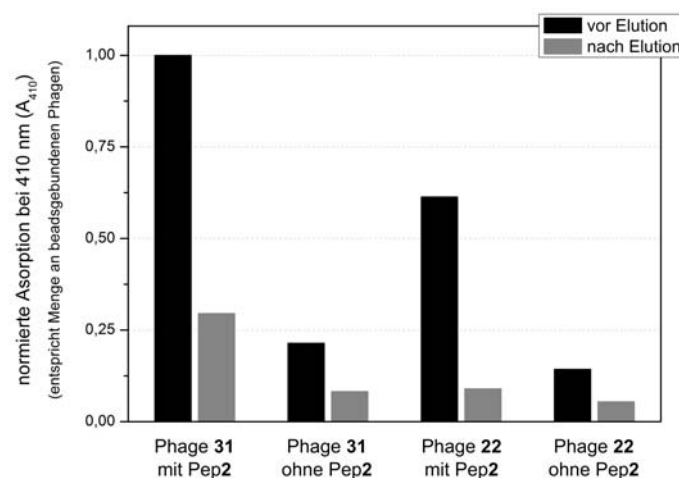


Abbildung 95. Analyse der Elutionseffizienz des Spleißproduktes 37 von den Beads durch Auswertung der normierten A₄₁₀-Werte des Phagen-ELISA vor und nach der Inkubation der Beads in 100 mM Biotinlösung. Neben dem spleißaktiven Phagen **31** (DnaB^C (12-154)) wurde auch der Kontrollphage **22** mit und ohne Pep2 (DTB-DnaB^N (1-11)) umgesetzt. Der Phagen-ELISA nutzt die Umsetzung des Substrates ABTS durch ein anti-pVIII/HRP-Konjugat.

Die Auswertung des Phagen-ELISAs (Abbildung 95) ergab, dass in allen Ansätzen zwischen 62 und 85% des Phagentiters vor der Elution nach der Behandlung mit Biotin-Lösung gemessen wurde. Absolut gesehen sind im Fall von Hybridphage **31** (DnaB^C (12-154)) bzw. Kontrollphage **22** mit Pep2 ca. 4,7 bzw. 4,3 Mal mehr Phagen vor der Elution detektierbar als bei Inkubation ohne Peptid. Diese Tatsache in Kombination mit der hohen Elution von 70%

(Phage **31**) bzw. 85% (Kontrollphage **22**) des Ausgangstiters legt die Vermutung nahe, dass beide Arten von Phagenpartikeln mit dem Peptid Pep2 unspezifisch interagieren können.

Nachdem eine selektive Elution mit Biotin sowohl bei Phage **31** (DnaB^C (12-154)) als auch **22** (Kontrollphage) möglich war, musste als nächstes getestet werden, ob der Elutionsschritt mit Biotin die für die Proteinevolution notwendige Diskriminierung zwischen spezifisch eluiertem Spleißprodukt und unspezifisch als Aggregat mit dem Peptid eluierten Phagen besitzt. Daher wurden Bakterienzellen sowohl mit dem Eluat als auch mit den auf den Beads immobilisierten Phagen direkt infiziert und die Anzahl kolonienbildender Einheiten bestimmt (Tabelle 8).

Tabelle 8. Vergleich der Infektion von Bakterienzellen mit entweder Biotin eluierten Phagen oder beads-gebundenen Phagen.

Spleißansatz	Infektion mit Eluat [absolute cfu]	Infektion mit Beads [absolute cfu]
Phage 31 mit Pep2	$1,4 \cdot 10^7$	$1,6 \cdot 10^7$
Phage 31 ohne Pep2	$2,7 \cdot 10^5$	$3,4 \cdot 10^7$
Kontrollphage 22 mit Pep2	$1,1 \cdot 10^6$	$1,8 \cdot 10^7$
Kontrollphage 22 ohne Pep2	$4,2 \cdot 10^5$	$4,6 \cdot 10^6$

Im Rahmen der Messungenauigkeit besteht zwischen dem Phagentiter mit und ohne Peptid des Phagen **31** (DnaB^C (12-154)) bei der Infektion mit den Beads kein Unterschied (Tabelle 8). Hingegen sind gegenüber dem Spleißansatz ohne Peptid in demjenigen mit Pep2 (DTB-DnaB^N (1-11)) nach Infektion mit Eluat ca. 50 Mal mehr Phagen gemessen worden. Allerdings wird auch der Wert des Kontrollphagen **22** mit Peptid und Infektion durch Eluat um den Faktor 12 zu Gunsten des spleißaktiven Phagen **31** (DnaB^C (12-154)), der mit Pep2 (DTB-DnaB^N (1-11)) inkubiert und mit Biotin eluiert wurde, diskriminiert. Daher liegt die Notwendigkeit der Biotin-Elution zur Verbesserung der Spezifität der Proteinevolution vor.

10.2.3. Die Anreicherung des Hybridphagen (DnaB^C (12-154))

Zur Anreicherung des Phagen **31** (DnaB^C (12-154)) gegenüber dem Kontrollphagen **22** wurden zur Doppelbestimmung zwei voneinander unabhängige 1:10000 Gemische erstellt. Jedes Gemisch wurde in Lösung 20 h mit dem Pep2 (DTB-DnaB^N (1-11)) inkubiert. Auf die Dialyse der Spleißansätze folgte die Immobilisierung des Spleißproduktes durch Bindung an das

Streptavidin der Beads. Bevor mit Biotin eluiert wurde, durchliefen die Beads verschiedene Waschschrte, um unspezifisch gebundene Phagenpartikel zu entfernen (Abbildung 96).

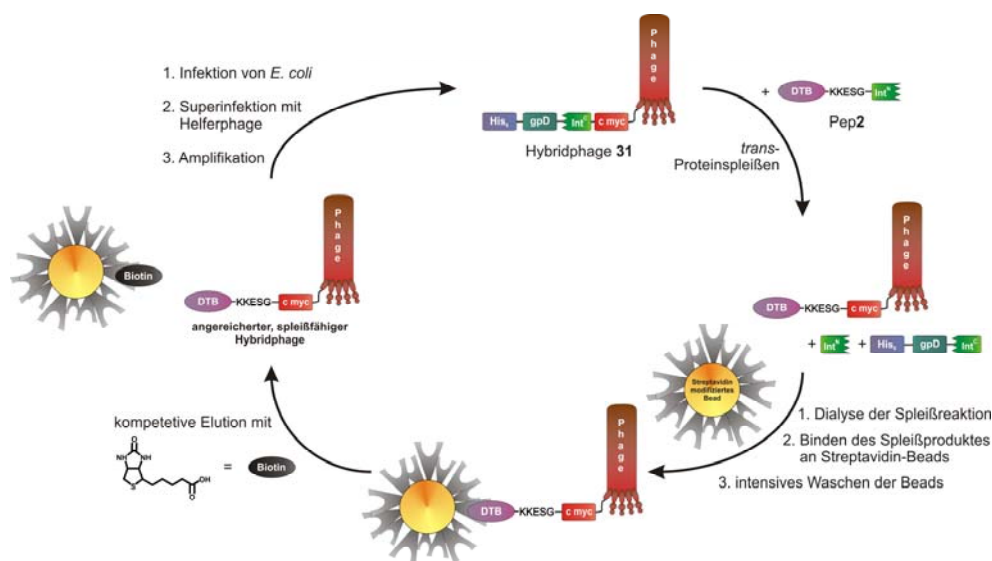


Abbildung 96. Schematische Darstellung des „trans-Proteinspleißens in Lösung“. Nach dem *trans*-Proteinspleiß von Pep2 (DTB-DnaB^N (1-11)) mit Phage 31 (DnaB^C (12-154)) wird die Reaktionslösung dialysiert und anschließend das Spleißprodukt über das Desthiobiotin an den Beads immobilisiert. An die intensiven Waschschrte schließt sich an, dass der angereicherte Hybridphage selektiv mit Biotin von den Beads eluiert wird. Mit dem Eluat werden Bakterienzellen infiziert.

Die Eluate der einzelnen Biopanningschrte wurden durch Infektion von Bakterienzellen auf ihre Phagenkonzentration untersucht (Abbildung 97).

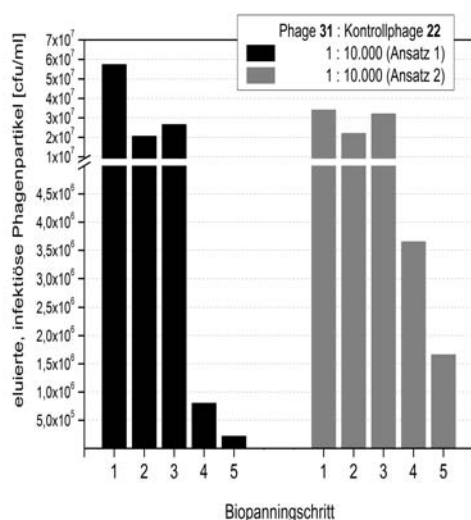


Abbildung 97. Darstellung der Konzentration der eluierten, infektiösen Phagen nach den einzelnen Biopanningschrten. Der spleißaktive Phage 31 (DnaB^C (12-154)) sollte gegenüber dem nicht spleißaktiven Kontrollphagen 22 aus einer 1:10000 Mischung angereichert werden. Die Experimente wurden unabhängig voneinander mit zwei Phagemischungen (Ansatz 1 und 2) durchgeführt.

In beiden Ansätzen fällt der Phagentiter des Biotineluates nach der 3. Runde merklich ab (Abbildung 97). Jedoch ist dieser Trend auch schon für den Phagentiter vor der Spleißreaktion zu beobachten, der nicht das normale Niveau von $5 \cdot 10^{13}$ bis $5 \cdot 10^{14}$ cfu/mL erreicht, sondern im Bereich von $1 \cdot 10^{12}$ cfu/mL gemessen wurde. Da sich ein Experiment mit 5 Biopanningschritten über 3 Wochen erstreckte, wurden die eluierten Phagen der Runde 2 und 4 jeweils über das Wochenende mit Eiskühlung im Kühlraum aufbewahrt. Es kann daher vermutet werden, dass die zweite Aufbewahrung über das Wochenende die Stabilität und/oder Infektiösität der Phagenpartikel beeinträchtigt hat. Ob die Inaktivierung der Phagen eine Folge der hohen Biotin-Konzentration im Phageneluat, einer Agglutination der Phagenpartikel oder einer bislang unbekannten chemischen Reaktionen war, kann nur gemutmaßt werden.

Trotz der unerwarteten Entwicklung der Infektiösität nach Biopanningschritt 4 wurden infizierte Bakterienkolonien auf das in ihnen vorhandene Phagemid-Plasmid hin untersucht. Das Phagemid-Plasmid des Phagen **31** (DnaB^C (12-154)) wurde von demjenigen des Kontrollphagen **22** durch Verdau mit den Restriktionsendonukleasen *Bam*HI und *Eco*RI unterschieden (Phage **31**: 996 und 3368 bp, Kontrollphage **22**: 637 und 3691 bp) (Abbildung 98).

Trotz der Verringerung des Phagentiters konnte nach 5 Biopanningschritten sowohl im Ansatz 1 als auch im Ansatz 2 der 1:10000 Gemische eine Anreicherung des spleißaktiven Phagen **31** (DnaB^C (12-154)) festgestellt werden (Abbildung 98). Beim Ansatz 1 enthielt von 56 untersuchten Kolonien 1 Kolonie das Plasmid des Phagen **31** (DnaB^C (12-154)) (insgesamt 179 Kolonien auf der Agar-Platte). Der Ansatz 2 wies mit 3 positiven aus 70 Kolonien (insgesamt 155 Kolonien auf der Agar-Platte) ein besseres Verhältnis auf. Aus diesen Ergebnissen errechnet sich ein Gesamtanreicherungsfaktor von 175 bzw 2,8 pro Biopanningschritt für Ansatz 1 und 400 bzw. 3,3 pro durchgeführtes Spleißexperiment für Ansatz 2. Die bessere Anreicherung im 2. Ansatz korreliert wahrscheinlich mit dem langsameren Abfall des Phagentiters in den Biopanningschritten 4 und 5.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass es in beiden Ansätzen gelungen war den nicht spleißaktiven Kontrollphagen **22** zu Gunsten des spleißaktiven Hybridphagen **31** (DnaB^C (12-154)) abzureichern. Zwar sind die Anreicherungsfaktoren noch gering, jedoch ist die erfolgreiche Durchführung des Anreicherungsexperimentes sowohl mit dem Phagen **16** (DnaB^C (107-154)) als auch dem Phagen **31** (DnaB^C (12-154)) ein großer Schritt in Richtung Proteinevolution des künstlich gespaltenen *Ssp* DnaB-Inteins mittels Phagen-Display.

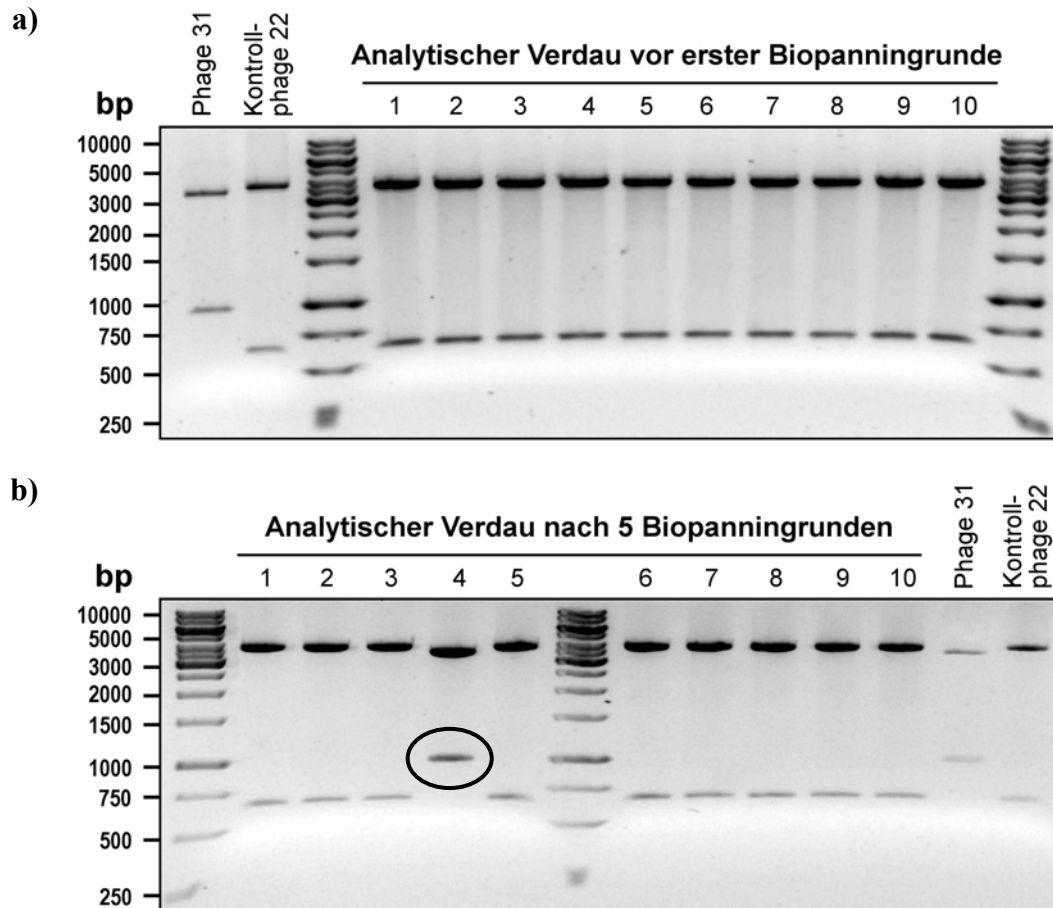


Abbildung 98. Exemplarische Darstellung von Agarose-Gelen der analytischen *Bam*HI/*Eco*RI-Verdaue von Phagemidplasmiden aus zehn zufällig ausgewählten Kolonien. In Abhängigkeit des präparierten Plasmides entstanden unterschiedliche Verdauemuster. Im Falle des Phagemidplasmides des spleißaktiven Phagen 31 (*DnaB*^C (12-154)) wurden zwei Banden bei 996 und 3368 bp gebildet. Das Plasmid des nicht spleißaktiven Kontrollphagen 22 ergab Banden bei 637 und 3691 Bp. Das Gel aus Teil a) zeigt die Situation vor dem Start der Anreicherung, im Teil b) sind 5 Biopanningrunden absolviert worden. In Probe 4 von Teil b) ist das Verdauemuster des Plasmides eines angereicherten, spleißaktiven Phagen markiert.

10.3. Auswirkung der Aminosäure an Position +2 auf das *trans*-Proteinspleißen des an Position 104 gespaltenen *Ssp* DnaB

10.3.1. Erzeugung einer DNA-Bibliothek an Position +2

Position +2 bezeichnet die zweite Aminosäure des C-Exteins und sollte in einer NNK-Bibliothek (N: alle 4 DNA-Basen, K: Guanin und Thymin) (Abbildung 99) randomisiert werden, um den Einfluss verschiedener Aminosäuren an jener Position auf die Spleißreaktion des an Position 104 künstlich gespaltenen *Ssp* DnaB-Intein zu untersuchen. Dazu wurde die Bibliothek über eine PCR mit einem degenerierten Primer hergestellt, wobei dieser ein NNK Kodon beinhaltete, das für alle 20 Aminosäuren und 1 Stoppsignal kodiert. Durch Expression

einzelner Mutanten der DNA-Bibliothek in BL21-Gold-Zellen und anschließender Aufreinigung über Ni-Affinitätschromatographie entstanden Varianten des Protein **40** (His₆-gpD-DnaB^C (107-154)-c myc, ca. 21 kDa).

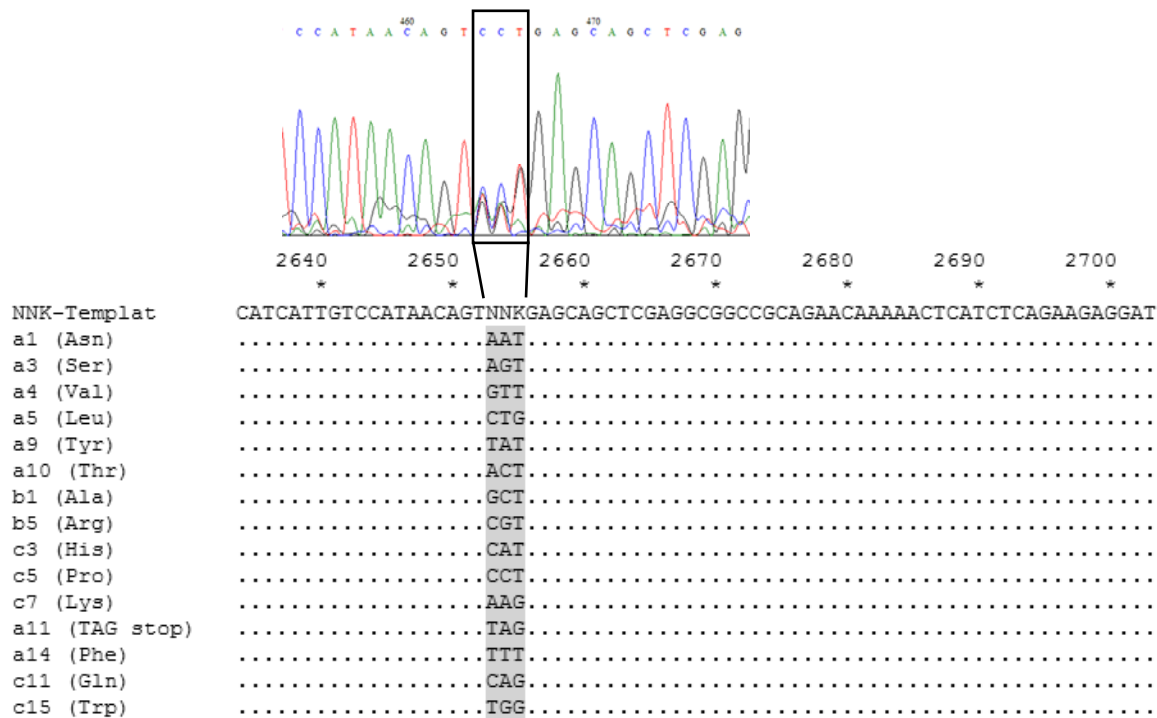


Abbildung 99. Alignment der sequenzierten Klone der Bibliothek an Position +2 im C-Extein.

Insgesamt lagen so 16 der 20 an Position +2 möglichen Aminosäuren kloniert vor (u. a. Abbildung 99). Daraus wurden 8 Aminosäuren (Ala, Glu, Ile, Lys, Leu, Pro, Gln, Trp und Tyr), die einen repräsentativen Schnitt bildeten, für weitere Untersuchungen ausgewählt. Die Mutanten mit diesen Aminosäuren an Position +2 wurden einer Spleißreaktion mit dem Protein **11** (DnaB^N (1-104)) unterzogen (Abbildung 100). Bei jeder Reaktion wurde die zweifache Konzentration an Protein **11** (20 µM) bezogen auf diejenige der Mutante (10 µM) verwendet. Das *trans*-Proteinspleißen erfolgte bei 25°C für 24 h.

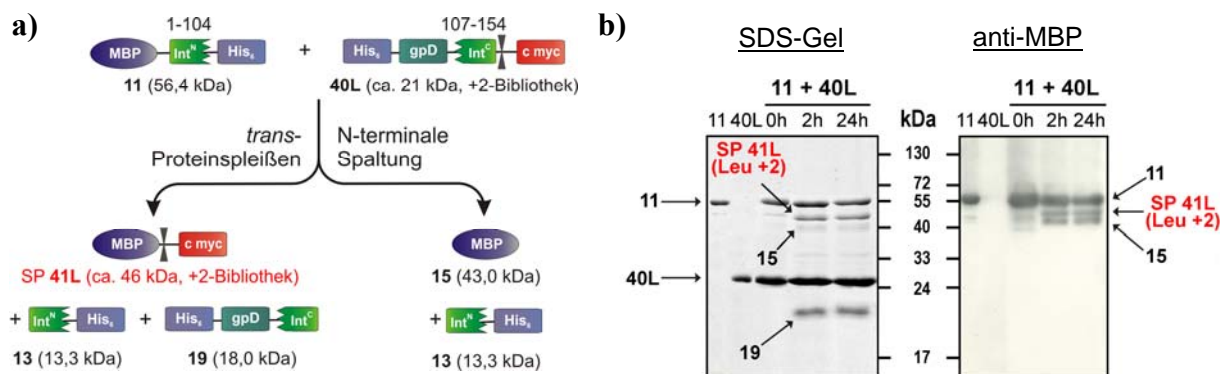


Abbildung 100. Spleißreaktion zwischen Protein 11 (DnaB^N (1-104)) und den Mutanten der +2-Bibliothek.
a) Schematische Darstellung der Spleißreaktion. b) Exemplarische Darstellung des SDS-Gels und des anti-MBP Western-Blots des *in vitro*-Spleißansatzes mit der Leu+2-Mutante zur Bestimmung der Ausbeute der Spleißreaktion bzw. der N-terminalen Spaltung.

10.3.2. Auswertung der *trans*-Proteinspleiß-Reaktionen der ausgewählten Mutanten der +2-Bibliothek

Die Spleißreaktion zwischen Protein 11 (DnaB^N (1-104)) und den Mutanten der +2-Bibliothek wurde mit einem anti-MBP Western-Blot hinsichtlich der Ausbeute an Spleißprodukt untersucht. Die Ergebnisse der densitometrischen Analyse sind in Tabelle 9 aufgeführt. Außerdem erteilte der Western-Blot auch Auskunft über den Ablauf einer N-terminalen Spaltungsreaktion. Die Ausbeute an dem Produkt des Spaltungsvorgangs ist ebenfalls in Tabelle 9 vermerkt.

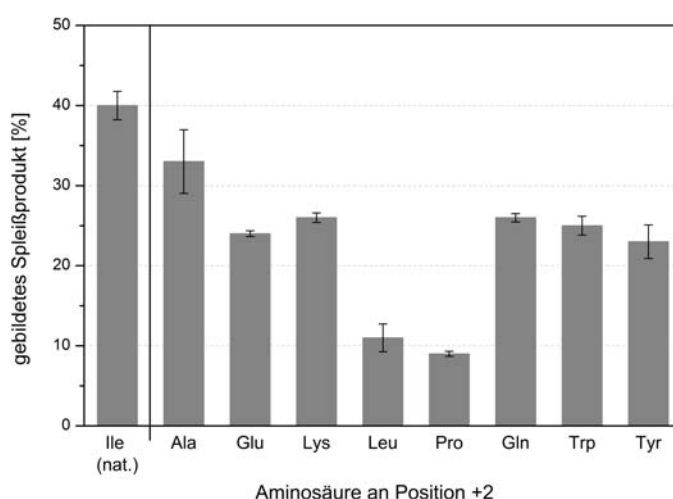


Abbildung 101. Auswertung der *in vitro*-Spleißreaktion der Mutanten von Protein 40 mit 11 (DnaB^N (1-104)) nach 24 h. Die Ausbeute wurde auf die Konzentration an Protein 40L bezogen und entsprechend der molaren Masse umgerechnet.

Tabelle 9. Auswertung der *in vitro*-Spleißreaktion der Mutanten mit Protein 11 (DnaB^N (1-104)).

Aminosäure an Position +2 von Protein 40L	gebildetes Spleißprodukt nach 24 h (bezogen auf Protein 40L)	N-terminale Spaltungsreaktion
Ile (nat.)	40 ± 2%	++
Ala	33 ± 4%	++
Glu	24 ± 1%	++
Lys	26 ± 1%	++
Leu	11 ± 2%	++
Pro	9 ± 1 %	++
Gln	26 ± 1%	+
Trp	25 ± 1%	+++
Tyr	23 ± 2%	++

(Die Ausbeute der Spleißreaktion und der Anteil des Produktes der N-terminalen Spaltung wurden jeweils bezogen auf das eingesetzte Protein **11** (DnaB^N (1-104)) densitometrisch auf dem anti-MBP Western-Blot beruhend ermittelt (N-terminale Spaltungsreaktion: 1-10% (+); 10-20% (++); 20-40% (+++).)

Ersetzt man die natürlich an Position +2 des C-Exteins des *Ssp* DnaB-Inteins vorkommende Aminosäure Ile durch Glu, Lys, Gln, Trp oder Tyr so wurde im Rahmen des Messfehlers jeweils Spleißausbeute von 25% Umsatz des Proteins **11** (DnaB^N (1-104)) erzielt. Lediglich im Falle der Aminosäuren Ile bzw. Ala wurden mit 40 bzw. 33% höhere Spleißausbeuten verzeichnet. Die Aminosäuren Leu oder Pro an Position +2 führten hingegen zu einer Verringerung der Ausbeute an Spleißprodukt auf ca. 10%. Die Ausbeute der Spleißreaktion mit Ile zeigte ein ähnliches Niveau wie die literaturbekannte, mögliche Ausbeute des Systems mit dem DnaB^C (107-154) [306], wobei MBP statt mit dem c myc-Tag mit einem His₆-Tag verknüpft wurde.

Die Nebenreaktion der N-terminalen Spaltung bewegte sich außer bei Gln und Trp im Bereich zwischen 10 und 20%. Bei Gln an Position +2 wurde nur 7% Umsatz des Proteins **11** (DnaB^N (1-104)) in das Produkt der N-terminalen Spaltung verzeichnet. Sofern Trp sich an Position +2 befindet überstieg die Ausbeute des Spaltproduktes diejenige der Spleißreaktion um den Faktor 1,5.

11. Diskussion zur Proteinevolution des *Ssp* DnaB-Inteins mittels Phagen-Display (Projekt 2)

11.1. Entwicklung einer Phagen-Display-Methode für gespaltene Inteine

Heutzutage ist es von immenser Bedeutung spezifisch chemisch modifizierte Proteine herzustellen, um sie nachher in Forschungsgebieten wie der Biotechnologie, Medizin oder auch der Grundlagenforschung anzuwenden. Als besonders interessant haben sich dabei Verknüpfungsmethoden erwiesen, die von normalen Peptidbindungen nicht zu unterscheiden sind und deshalb als „spurlos“ bezeichnet werden. Diese Art von Verknüpfungen ermöglichen u. a. Inteine, indem sie zwei flankierende Aminosäuresequenzen, die Exteine, über eine native Peptidbindung kovalent miteinander verknüpfen. Die künstliche Spaltung von Inteinen eröffnet die Möglichkeit in Abhängigkeit der Größe der entstehenden Fragmente (Extein und Inteinhälfte) auch semisynthetische Spleißprodukte zu bilden. Da die Spleißreaktion aber sehr empfindlich gegenüber experimentellen Randbedingungen, wie z. B. der Temperatur, dem pH-Wert, der Reaktionszeit, der Konzentration an denaturierenden Reagenzien oder der Größe der Exteine ist, besteht eine reelle Möglichkeit mit Hilfe der Proteinevolution die Spleißaktivität bekannter Inteine zu verbessern.

Im Rahmen des Projektes 2 dieser Arbeit sollten Methoden entwickelt werden, um das an Position 104 bzw. Position 11 künstlich gespaltene *Ssp* DnaB-Intein durch Phagen-Display in seinen Eigenschaften zu verbessern. Sie sollten die selektive Anreicherung von Phagenpartikeln, die ein Inteinfragment präsentierten, das unter den gegebenen Randbedingungen aktiv war, ermöglichen.

Je nach eingesetztem Intein wurden zwei unterschiedliche Arten des *trans*-Proteinspleißens durchgeführt. Im Falle des an Position 104 gespaltenen DnaB-Intein wurde das „Spleißen an der festen Phase“ erprobt (Abbildung 81). Das heißt, dass das Fusionsprotein mit dem Int^N-Fragment zuerst an der festen Phase (Streptavidin modifizierte, magnetische Beads) immobilisiert wurde und anschließend mit dem Phagen, der die Int^C-Hälfte präsentierte inkubiert wurde. Das entstehende Spleißprodukt war deshalb ebenfalls an das Streptavidin gebunden und konnte entweder zur direkten Infektion mit Bakterienzellen inkubiert werden oder vor der Infektion mit Biotin kompetitiv eluiert werden. Deshalb wies das Int^N-Fusionsprotein ein N-terminales Streptavidinbindendes Protein (SBP) auf, das verglichen mit Biotin ($1 \cdot 10^{-15}$ M) eine Bindungsaffinität bezüglich des Streptavidin von 2,5 nM besaß. Das an Position 11 gespaltene *Ssp* DnaB-Intein wurde beim „Proteinspleißen in Lösung“ eingesetzt (Abbildung 89).

Hierbei wurde das synthetische, N-terminal Desthiobiotin modifizierte Int^N-Peptid direkt mit dem das Int^C-Fragment präsentierenden Hybridphagen inkubiert. Auf einen Dialyseschritt zur Abtrennung unreaktierten Peptides folgend, wurde das Spleißprodukt über das Desthiobiotin an Streptavidin (Bindungsaffinität $1 \cdot 10^{-12}$ M) immobilisiert. Anschließend konnten die Beads entweder direkt mit zu infizierenden *E. coli*-Zellen inkubiert werden oder für die Infektion wurde das Biotin-Eluat der Beads verwendet.

Die Vorarbeiten

Vor dem Phagen-Display-Experiment wurden diverse Vorversuche durchgeführt. So wurde gezeigt, dass beide Int^N-Fusionen sowohl mit aufgereinigtem Protein (DnaB^N (1-104): Abbildung 82; DnaB^N (1-11): Abbildung 90) als auch mit dem entsprechenden Hybridphagen (DnaB^N (1-104): Abbildung 83; DnaB^N (1-11): Abbildung 92) Spleißaktivität besaßen.

Das Spleißen an der festen Phase musste hinsichtlich zwei Problemen optimiert werden. Problem eins bestand in der Verringerung des frei in Lösung vorhandenen Int^N-Proteins, um als Spleißpartner des Hybridphagen nur das an die Beads immobilisierte DnaB^N-Fusionsprotein zu nutzen. Dieses Ziel wurde durch ein stringentes Waschprotokoll erreicht, sodass die Konzentration an freiem Int^N-Protein soweit abgesenkt wurde, dass keine Detektion im Western-Blot mehr möglich war (Abbildung 85). Das zweite Problem bildeten die unspezifisch an die Beads bindenden Phagenpartikeln. Die beste Lösung zur Minimierung des Problems bestand im Blocken der Beads über Nacht in Puffer mit 3% BSA und 0,05% Tween 20 sowie der Inkubation der Beads nach der Immobilisierung des Int^N-Proteins in Puffer mit 0,05% Tween 20. Trotz der verschiedenen Blockschritte konnte eine unspezifische Bindung von Phagenpartikeln nicht vollständig verhindert werden, so dass neben dem Spleißprodukt auch „falsche“ Phagen eluiert werden und die Mutanten-Selektion negativ beeinflussen können. Daher kann nur das Absolvieren eines *preclearing* Schrittes weitgehend verhindern, dass die unspezifisch an die Beads bindenden Phagenpartikel der Phagenlösung vor dem Spleißen entzogen werden. In diesem Verfahren wird die Phagenlösung vor der Spleißreaktion mit Beads inkubiert und die unspezifisch bindenden Phagen mit den Beads verworfen. Hierbei kann es jedoch zu einem starken Rückgang des Phagentiters kommen, weshalb ein *preclearing* Schritt nicht nach jedem Biopanningzyklus angewandt werden sollte. Zuletzt konnte gezeigt werden, dass die selektive Elution mit Biotin zu einer Diskriminierung der Phagenkonzentration zu Gunsten der spleißaktiven Hybridphagen führt. Ein Ergebnis, das durch die direkte Infektion nicht möglich war.

Die bereits genannten Verbesserungen wurden auch im Falle des Spleißens in Lösung genutzt.

Für diese Methode ist von besonderer Bedeutung nicht reagiertes Int^N-Peptid vor der Immobilisierung des Spleißproduktes weitgehendst aus dem Spleißansatz zu entfernen. Da andernfalls das wesentlich kleinere Peptid einen Großteil der Bindestellen am Streptavidin vor dem sterisch anspruchsvollen Spleißprodukt besetzen kann und daraus folgend nicht alle spleißaktiven Intein-Mutanten während der Proteinevolution zurückgewonnen werden können. Deshalb wurde mit dem Spleißansatz vor der Immobilisierung des Spleißproduktes ein Dialyseschritt durchgeführt. Obwohl die verwendete Dialysemembran die größte Porenweite des eingesetzten Membranmaterials aufwies, kann Abbildung 94 entnommen werden, dass ca. 95% des nach 24 h nicht umgesetzten Peptides sich auch nach der Dialyse weiterhin im Reaktionsmix befanden. Daher kann als Lösungsmöglichkeit zukünftig lediglich untersucht werden, ob eine Verlängerung der Dialysezeit eine Verbesserung herbeiführt. Auch bei dieser Version des *trans*-Proteinspleißens musste das Verfahren hinsichtlich einer Minimierung der unspezifischen Interaktion der Phagenpartikel analysiert werden. Zwar konnte das Problem durch das Blocken der Beads, des Reaktionsgefäßes und der Dialysemembran abgeschwächt werden, jedoch zeigte sich, dass der als Negativ-Kontrolle verwendete, nicht spleißaktive Kontrollphage in Gegenwart des Int^N-Peptids zu 60% der Konzentration des spleißaktiven Hybridphagen an die Beads bindet (Abbildung 95). Allerdings können von dem Kontrollphagen 85% mit Biotin-Lösung eluiert werden, also anzunehmen ist, dass die Phagen durch unspezifische Interaktion mit dem Peptid an die Beads immobilisiert werden. Daher muss während der Proteinevolution mit einem hohen Hintergrundsignal gerechnet werden. Die unspezifischen Wechselwirkungen zwischen den Phagenpartikeln und dem Peptid wären auch eine Erklärung dafür, warum durch die Dialyse nur ca. 5% des nicht reagierten Int^N-Peptids aus dem Spleißansatz entfernt werden konnten. Schließlich waren die Poren der Dialysemembran für die Phagenpartikel mit an sie unspezifisch gebundenem Peptid bei weitem zu klein. Nach Aufkochen der Probe für den Western-Blot (Abbildung 94) waren jedoch jene Wechselwirkungen aufgehoben, sodass das Int^N-Peptid detektiert werden konnte. Ein möglicher Lösungsansatz könnte in einer C-terminalen Modifikation des Int^N-Peptids mit z. B. Biotin zu suchen sein. Dieser zweite Affinitäts-Tag wird ausschließlich zur Abtrennung von Peptid/Phagen-Aggregaten genutzt und die Selektion des Spleißproduktes erfolgt über die N-terminale Modifikation des Peptids z. B. ein Fluorescein-Molekül.

Die Anreicherungsexperimente

Die Auswirkungen der verschiedenen Optimierungen auf das Phagen-Display-Experiment sollten in einer Anreicherung des spleißaktiven, Int^C präsentierenden Hybridphagen aus einer 1:10000 Mischung mit dem nicht spleißaktiven Kontrollphagen ermittelt werden.

Zunächst soll das Experiment mit dem an Position 104 gespaltenen DnaB-Intein erörtert werden, in dem das *trans*-Proteinspleißen an der festen Phase mit Biotinelution des gebildeten Spleißproduktes angewandt wurde. Nach jeder Elution mit Biotin wurde die Gesamtkonzentration aus Int^C präsentierendem Hybridphagen und dem Kontrollphagen durch Testinfektion von Bakterienzellen bestimmt. Hierbei wurde der erwartete Verlauf beobachtet (Abbildung 87), d. h. nach einem Einbruch der Phagenkonzentration in der 2. und 3. Runde (ca. 0,5% des Titors nach der 1. Biopanningrunde), der aus der geringen Konzentration an spleißaktivem Phagen und gleichzeitiger Abreicherung des Kontrollphagen resultiert, stieg der Phagentiter in den Runden 4 und 5 exponentiell auf ca. 30% des Titors nach der 1. Biopanningrunde an. Damit bewegte sich die Phagenkonzentration in dem in der Literatur für spezifisch, eluierte Phagen als typisch angenommenen Bereich von 10⁴ bis 10⁹ cfu/mL [336]. Nach Restriktionsverdau von Plasmiden aus zufällig ausgewählten, infizierten Kolonien konnte ein Anreicherungsfaktor von insgesamt 1250 oder 4,1 pro Runde errechnet werden (Abbildung 88). Dieser Faktor liegt zwar über dem Signifikanzniveau von 2 pro Biopanningschritt [336], jedoch ist erst ab einem Faktor von 10 pro Runde eine statistische Sicherheit des Ergebnisses des Restriktionsverdaus bei einer überschaubaren Anzahl an untersuchten Kolonien gegeben. Allerdings muss in diesem Zusammenhang auch bedacht werden, dass im vorliegenden Experiment ein höherer Schwierigkeitsgrad während der Proteinevolution vorliegt, da nicht nur auf die Bindung zweier Komponenten selektiert wird, sondern darauf dass das künstlich gesplattene Intein-Fragment erst mit seinem Gegenpart assoziieren, sich umfalten und schließlich die Spleißreaktion katalysieren muss.

Im Falle des an Position 11 künstlich gespaltenen *Ssp* DnaB-Inteins wurden zwei voneinander unabhängige Anreicherungsexperimente durchgeführt. Der spleißaktive Hybridphage sollte erneut aus je einer 1:10000 Mischung mit dem Kontrollphagen angereichert werden. Für beide Ansätze wurde die Phagenkonzentration nach Elution mit Biotin über 5 Biopanningrunden hinweg analysiert. Zunächst zeigte der Phagentiter schon in der 3. Runde eine Erholung nach dem Einbruch in der 2. Runde (Ansatz 1: 37%; Ansatz 2: 65% des Titors nach der 1. Biopanningrunde), um schließlich in der Runde 4 und 5 in beiden Fällen auf 0,4% bzw. 5% des Titors nach der 1. Biopanningrunde abzufallen (Abbildung 97). Der relativ gering ausfallende Einbruch in der 2. Runde kann entweder positiv oder negativ erklärt werden. Die posi-

tive Erklärung nimmt an, dass während des *trans*-Proteinspleißens in Lösung soviel Spleißprodukt entstanden ist, dass viel an den Beads immobilisiert werden konnte und daher viele spleißaktive Phagen eluiert und amplifiziert werden konnten. Im anderen Fall muss davon ausgegangen werden, dass eine große Zahl an Kontrollphagen miteluiert wurde und daher der Phagentiter künstlich auf dem hohen Konzentrationswert gehalten wurde. Bezüglich des starken Abfalls des Phagentiters in Runde 4 und 5 muss bedacht werden, dass die Dauer des gesamten Experimentes mit 3 Wochen ziemlich lang war. Daraus folgend mussten die eluierten Phagenpartikel zwei Mal über das Wochenende auf Eis aufbewahrt werden, wobei sie sich den gesamten Zeitraum in gepufferter 100 mM Biotinlösung befanden. Daher kann die Stabilität und/oder Infektiosität der Phagenpartikel entweder durch Degradation, Aggregation oder einer bislang unbekannten, chemischen Reaktion beeinträchtigt worden sein. Trotz allem sind die absoluten Phagenkonzentrationen nach der 5. Runde (Ansatz 1: $2,1 \cdot 10^5$ cfu/mL; Ansatz 2: $1,7 \cdot 10^6$ cfu/mL) weiterhin oberhalb der Grenze von ca. 10^3 Phagenpartikel, die für eine Fortführung eines Proteinevolutions-Experimentes notwendig sind [336]. Deshalb sollte erneut durch Restriktionsverdau von Plasmiden aus zufällig ausgewählten, infizierten Kolonien ihre Identität bestimmt werden (Abbildung 98). Für den Ansatz 1 war eine von 56 Kolonien positiv und beim Ansatz 2 3 von 70 Kolonien. Hieraus ergaben sich Anreicherungsfaktoren von 175 bzw 2,8 pro Biopanningschritt für Ansatz 1 und 400 bzw. 3,3 pro durchgeführtes Spleißexperiment für Ansatz 2. Diese lagen, wie bereits im vorhergehenden Abschnitt erwähnt, in der Nähe der Grenze für eine signifikante Anreicherung von 2 pro Biopanningschritt [336]. Daher kann vermutet werden, dass die Abreicherung des Kontrollphagen nicht umfassend erfolgt war. Hierfür kann entweder die hohe Konzentration an mit Biotin eluierten Kontrollphagen durch die wahrscheinliche unspezifische Interaktion mit dem Int^N-Fragment verantwortlich sein, oder das freie, unreaktierte Peptid hat am Streptavidin zu viele Bindestellen besetzt, um genügend Spleißprodukt zu immobilisieren und danach zu eluieren bzw. spleißaktiven Hybridphagen für den nächsten Biopanningschritt zu amplifizieren. Abschließend kann resümiert werden, dass sowohl für das an Position 104 als auch dasjenige an Position 11 künstlich gespaltene, Phagen-präsentierte DnaB-Intein eine Methode zur Selektion eines katalytisch aktiven Inteins mittels Phagen-Display gefunden wurde und die Proteinevolution begonnen werden kann.

11.2. Modifikation von Proteinen und Peptiden auf der Phagenoberfläche

Schnell nach der Einführung der Methode des Phagen-Display durch Smith [58] war klar, dass sie große Anforderungen an das zu präsentierende Peptid oder Protein stellt. Besonders im Hinblick auf posttranslational modifizierte oder Proteine, die eine komplexe Tertiärstrukturen ausbilden ist der in der Regel zum Ausschleusen der Phagenfusionsproteine genutzte Sec-Sekretionsapparat nicht geeignet. Außerdem ist der Einbau von unnatürlichen Aminosäuren oder organisch-chemischen Bausteinen in Phagen-präsentierte Proteine, um diese Modifikationen mit der Durchmusterung von Proteinen, die aus DNA-Bibliotheken hervorgegangen sind, zu kombinieren, ein lohnenswertes Untersuchungsobjekt.

Paschke und Höhne lösten die Probleme mit dem Sec-Sekretierungsapparat in dem sie das zu untersuchende Protein als Fusion mit der Fos-Domäne eines Leucin-Reißverschluss-Systems durch den Tat-Sekretionsapparat (*twin-arginine translocation pathway*, [337]) ausschleusten (Abbildung 102a)) [338]. Dieser Sekretionsweg erlaubt ausschließlich den Export von vollständig und richtig gefalteten Proteinen aus dem Cytoplasma. Den Gegenpart auf der Phagenoberfläche bildete die Jun-Domäne des Leucin-Reißverschluss-Systems, die nun im Periplasma das Fusionsprotein über die Fos-Domäne an den Phagen binden konnte. Das im Rahmen dieser Arbeit entwickelte *trans*-Proteinspleißen mit dem an Position 104 künstlich gespaltenen *Ssp* DnaB-Intein auf der Oberfläche eines Bakteriophagen kann ebenfalls Phagen-präsentierte Proteine mit anderen Proteinen modifizieren, indem eine kovalente native Peptidbindung zwischen den beiden Proteinen entsteht (Abbildung 102b)). Diese zwischen den Proteinen etablierte Verknüpfung ist später von den Bindungen zwischen den Aminosäuren der Proteine nicht unterscheidbar und kann daher als „spurlos“ bezeichnet werden. Limitierungen des Tat-Sekretionssystems werden gleichfalls beim Proteinspleißen auf der Phagenoberfläche umgangen, da das Fusionsprotein mit dem Int^N-Fragment vor der *in vitro*-Spleißreaktion rekombinant exprimiert und aufgereinigt wird. Daher können auch Modifikationen von z. B. Aminosäure-Seitenketten des Proteins vor der Spleißreaktion durchgeführt werden. Außerdem ist die segmentelle Isotopenmarkierung des Int^N-Fusionsproteins denkbar. Allerdings muss auch bedacht werden, dass sich zunehmend größere N-Exteine negativ auf die Ausbeute der Spleißreaktion auswirken können. Dem kann jedoch durch Proteinevolution des bestehenden Systems oder die Nutzung robusterer Inteine entgegengewirkt werden.

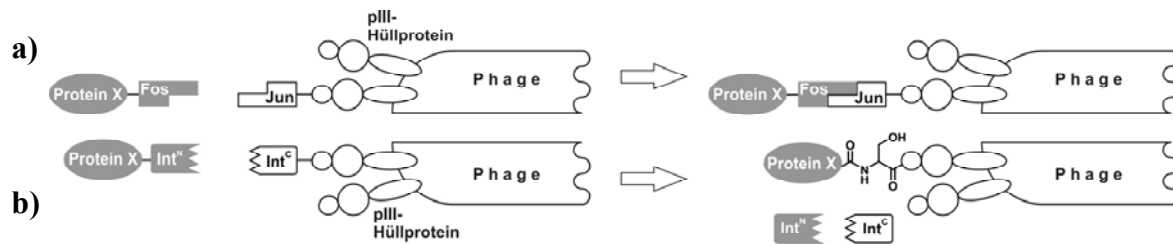


Abbildung 102. Modifikation von Phagen mit gefalteten Proteinen. a) Die Verbindung zwischen dem Phagen-präsentierten Fusionsprotein (pIII-Jun, weiß) und dem anderen Fusionsprotein (Protein X-Fos, grau) erlaubt die Bildung des Leucin-zipper-System aus der Fos- und der Jun-Domäne. b) Durch eine *trans*-Proteinspleißreaktion wird das Protein X mit dem Phagen kovalent verbunden, wobei sowohl das Int^N- als auch das Int^C-Fragment aus dem neuen Phagen-präsentierten Fusionsprotein entfernt werden.

Durch diese beiden Verfahren (Abbildung 102) war es nun möglich auch große, sterisch anspruchsvolle Proteine auf der Phagenoberfläche zu präsentieren. Jedoch wäre auch die Nutzung posttranslationaler Modifikationen und unnatürlicher Aminosäuren oder organisch-synthetischer Bausteine mit den präsentierten Proteinen wünschenswert. Deshalb mussten Methoden entwickelt werden, um jene Veränderungen an den Proteinen durchführen zu können.

Walsh und Mitarbeiter nutzten zu den Phagen hinzugegebene Enzyme aus, um eine selektive Immobilisierung über die Bindung von Biotin an Streptavidin zu erreichen (Abbildung 103a)) [339, 340]. Sie setzten Biotin-CoA als Substrat für die Phosphopantetheinyl-Transferasen Sfp und AcpS mit einer Phagenbibliothek, die 12 Aminosäuren umfassende Peptidsequenzen präsentierte. Nur die Modifikation des Serin an Position 3 der Peptidsequenz mit Biotin konnte eine Bindung der Phagen an das Streptavidin bewirken und zu einer Selektion der entsprechenden Phagenpartikel führen. Ein Vergleich dieses Ansatzes zur Modifikation von Phagen-präsentierten Proteinen zeigt einen weiteren Vorteil des *trans*-Proteinspleißens (Abbildung 103d)), denn die Zugabe von aktiven Enzymen ist nicht notwendig, da nach der Assoziation und Umfaltung der Intein-Hälften die gesamte katalytische Funktionalität aus der Struktur des Inteins resultiert. Je nach dem eingesetzten Intein sind auch die Beschränkungen, die die Aktivität eines Enzyms an den pH-Wert oder die Temperatur des Puffers stellt, z. T. aufgehoben, da Inteine charakterisiert wurden, die über einen Temperaturbereich von 6 bis 37°C und auch in 6 M Harnstofflösung spleißaktiv sind.

Um die Komplexität der präsentierten Protein- oder Peptid-Bibliotheken weiter zu erhöhen, war es notwendig die Limitierung auf 20 proteinogene Aminosäuren zu überwinden. Zwar war es möglich Lys- und Cys-Seitenketten mit organischen Molekülen zu verändern oder Tyrosin zu phosphorylieren [341], aber alle Modifikationen waren nicht auf die beabsichtigte Aminosäure beschränkt, sodass ebenfalls Aminosäure-Seitenketten von Hüllproteinen modifiziert wurden.

Unter Ausnutzung der Methode der nativen, chemischen Ligation (engl. *native chemical ligation*, NCL [342]) gelang es Dwyer *et al.* das C-terminale Fragment des Protease-Inhibitors Eglin C, das auf einem Phagen präsentiert wurde, mit einem künstlichen N-terminalen Fragment, das an Position 25 die Bausteine Kynurenin oder Norvalin aufwies, zu komplettieren (Abbildung 103b)) [343]. Um Raum für die unnatürlichen Aminosäuren zu schaffen wurde an den Positionen 52 und 54 im C-terminalen Teil je eine DNA-Bibliothek eingeführt. Die Bindungsknüpfung, die von einer nativen Peptidbindung nicht unterschieden werden kann, somit also „spurlos“ erfolgt, fand zwischen dem N-terminalen Cystein des Phagenfusionsproteins und dem carboxyterminalen Thioester des Peptids statt. Die NCL auf dem Phagen ist im Ergebnis ähnlich zum Proteinspleißen auf dem Phagen (Abbildung 103b) und d)). Besonders hinsichtlich der Vorteile der gezielten Platzierung der unnatürlichen Aminosäure und der gleichzeitigen Kombination mit der Vielfalt der Proteinvarianten, die durch eine DNA-Bibliothek zugänglich sind und über Phagen-Display leicht untersucht werden können, ist das System vergleichbar mit dem *trans*-Proteinspleißen vorrangig des an Position 11 künstlich gespaltenen DnaB-Inteins. In beiden Fällen wird ein synthetisches Peptid spurlos mit einem Phagen-präsentierten Protein bzw. Proteinfragment verknüpft. Daher ist auch der Nachteil der Limitierung der Länge des Peptids und damit der gezielten Position des organischen Bausteins durch die organische Synthese beim Proteinspleißen gegeben. Jedoch sind im Falle des *trans*-Proteinspleißens weder die Generierung eines N-terminalen Cysteins, die mit erheblichen Schwierigkeiten verbunden sein kann [83], notwendig, noch sind die recht harschen Bedingungen der NCL (0,5% Thiophenol und 6 M Guanidiniumhydrochlorid, sowie zum Stoppen der Reaktion 10 mM Dithiothreitol), unter denen der Bakteriophage nur bedingt stabil ist, anzuwenden. Beim Proteinspleißen muss der Phage lediglich gegenüber einer Inkubation mit 2 mM Dithiothreitol in einem Puffer von pH 7 stabil sein.

Die Beschränkung auf eine bestimmte Anzahl an modifizierbaren Positionen umging die Arbeitsgruppe von Schultz durch die von ihnen entwickelte „Nonsense-Kodon Unterdrückung“ (engl. *nonsense codon suppression*, Übersicht in [344]). Diese Methode nutzt die Unterdrückung eines TAG-Stop-Kodons mit einem zum Wirtsorganismus orthogonalen Paar aus tRNA und tRNA-Synthetase, wobei die Spezifität der tRNA-Synthetase durch Proteinevolution auf eine bestimmte unnatürliche Aminosäure oder einen organischen Baustein hin zugeschnitten wurde. Zur Modifikation einer Peptidsequenz, die mit dem pIII fusioniert war, wurde das zu *E. coli* orthogonale System der TAG supprimierenden Tyrosin tRNA und die entsprechende tRNA-Synthetase aus dem Organismus *Methanococcus jannaschii* verwendet [345]. Der Vorteil dieser Methode besteht in der gezielten Platzierung der unnatürlichen Ami-

nosäure innerhalb einer Proteinsequenz durch die frei wählbare Position des Stop-Kodons im Gen. Neben der schwierigen Umsetzung des Systems und der anspruchsvollen Proteinevolution der Syntethasen findet der gesamte Austausch-Prozess *in vivo* statt, womit für *E. coli* toxische oder durch die Modifikation toxisch gewordene Proteine, einen Großteil der Zellkultur vernichten kann. Hingegen können auf der Oberfläche des Phagen auch zelltoxische Proteine präsentiert werden, da dieses Verfahren vollständig *in vitro* abläuft.

Die Arbeitsgruppe Schultz selbst sah in einer *in vitro* ablaufenden Click-Reaktion ([3+2]-Cycloaddition, [346]) eine Lösungsmöglichkeit (Abbildung 103c)) [345]. Daher wurde an der Position des Stop-Signals ein *p*-Azidophenylalanin, dessen Funktionalität unter literaturbekannten Reaktionsbedingungen [347] selektiv mit endständigen Alkinen über einen Fünfring eine kovalente Bindung ausbildet, in eine Phagen-präsentierte Aminosäuresequenz eingebaut.

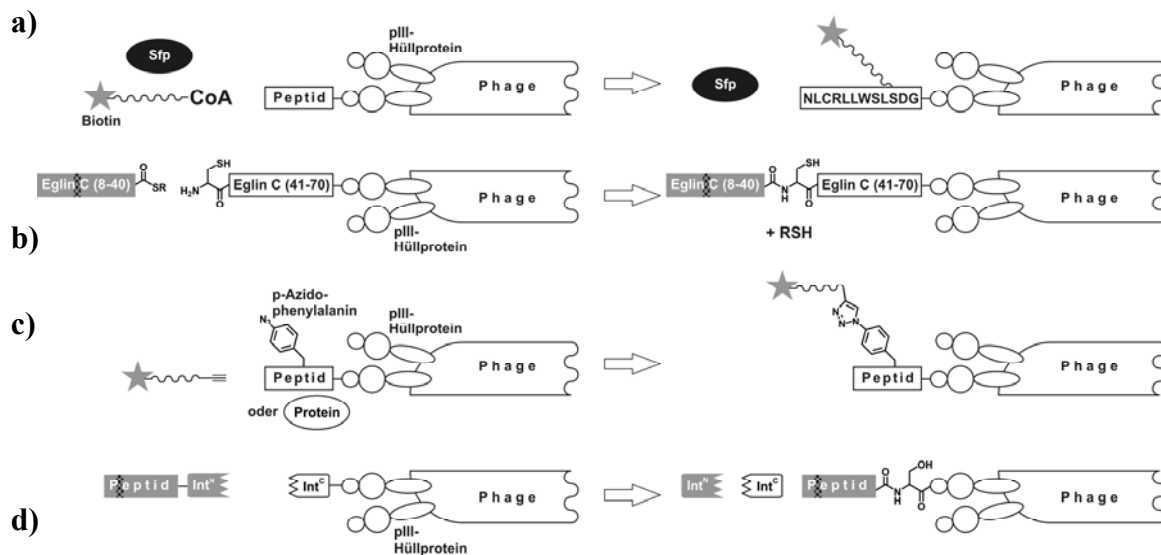


Abbildung 103. Modifikation von Phagen mit organisch-chemischen Bausteinen. a) Das Substrat Biotin-CoA (grau) konnte mit Hilfe der Phosphotransferase Sfp (schwarz) auf das Serin einer Phagen-präsentierten Peptid-Sequenz (weiß) übertragen werden. b) Das Phagen-präsentierte C-terminale Eglin C-Fragment (weiß) konnte durch NCL mit einem N-terminalen Eglin C-Fragment (grau) kovalent verknüpft werden. Das N-terminale Fragment besaß an einer Position (gepunktet) eine unnatürliche Aminosäure, die somit in die Eglin C-Struktur eingeführt wurde. c) Anstelle eines Stop-Kodons wurde durch die Nonsense-Kodon Unterdrückung die unnatürliche Aminosäure *p*-Azidophenylalanin in ein Protein oder Peptid (weiß) eingebaut, das auf der Phagenoberfläche präsentiert wird. Dieser Baustein kann in einer Click-Reaktion mit einem Derivat eines endständigen Alkins (grau) modifiziert werden. d) Der Phage wird über das *trans*-Proteinspleißen mit dem synthetischen Int^N-Fusionspeptid kovalent modifiziert, wobei das Peptid unnatürliche Aminosäuren (gepunktet) aufweisen kann.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass je nach Wahl des Inteins unterschiedliche Modifikationen durch das *trans*-Proteinspleißen auf der Phagenoberfläche denkbar sind. Phage 16 (DnaB^C (107-154)) ist eher geeignet durch das an Position 104 gesplattene Intein die

Bindung eines weiteren Proteins an das Fusionsprotein zu katalysieren, wobei der N-terminale Bindungspartner aufgrund der Größe des DnaB^N (1-104)-Fragmentes rekombinant hergestellt werden muss. Im Hinblick auf eine Modifikation mit unnatürlichen Aminosäuren ist das an Position 11 gespaltene Intein (Phage **31**) besser geeignet, weil der gesamte N-terminale Teil synthetisch durch Festphasen-Peptidsynthese zugänglich ist. Daher ist eine Vielzahl an Anwendungen denkbar, wie z. B. die Einführung biophysikalischer Sonden in Phagen-präsentierte Proteine oder die Komplementierung gespaltener Proteine durch die spurlose Verknüpfung zweier Proteinfragmente. Weiterhin ist die Modifikation von Hybridphagen durch Inteine als *in vitro*-Methode auch für zelltoxische Proteine zugänglich. Schließlich bildet die Erweiterung von DNA-Bibliotheken durch unnatürliche Bausteine die Perspektive vollkommen neuartige Proteine zu evolvieren und mittels Phagen-Display schnell zu analysieren.

11.3. Komplementierung von Proteinen durch Assoziation der Fragmente

Die Rekonstitution der Proteinaktivität von künstlich gespaltenen Proteinen kann in zwei Prozesse unterteilt werden. Zum einen eine Assoziation der beiden Proteinfragmente und zum anderen muss anschließend eine strukturelle Rekonstitution des aktiven Proteins erfolgen. Die Gesamtheit dieser Prozesse wird als „Protein-Fragment-Komplementierung“ bezeichnet [348].

Es werden zwei Kategorien von Proteinfragmenten unterschieden. Erstens diejenigen, die nach der Spaltung keine natürliche Affinität zueinander besitzen. Sie müssen also entweder durch einen De-/Renaturierungsschritt oder hinzugefügte „Dimerisierungssysteme“ in räumliche Nähe zueinander gebracht und zur Bildung der aktiven Struktur gezwungen werden. Zweitens die Proteinfragmente, die trotz der künstlichen Spaltung spontan miteinander assoziieren und zum aktiven Protein umfalten.

Beide Varianten des künstlich gespaltenen *Ssp* DnaB-Inteins fallen in die zweite Kategorie. Diese Tatsache ist bei der Spaltstelle S0 (Position 104, siehe Kapitel 7.3) nicht verwunderlich, da sich ein langes, antiparalleles β -Faltblatt bildet, jedoch besitzt das N-terminale Fragment, das aus der Spaltstelle S1 hervorgeht, nur 11 Aminosäuren zur Assoziation. Als Vergleich kann das von Shi und Muir untersuchte natürlich gespaltene DnaE-Intein herangezogen werden [349]. Eine Betrachtung des isoelektrischen Punktes des DnaE-Inteins erbrachte bei pH = 7 eine Ladungsverteilung von -13,6 für das Int^N- und +2,1 für das Int^C-Fragment. Somit musste von einer ersten Assoziation über Wechselwirkungen unterschiedlich geladener Ami-

nosäure-Seitenketten ausgegangen werden, welches durch Untersuchungen mit Puffern unterschiedlicher Salzgehalte bestätigt wurde. Die zwar mit entgegengesetztem Vorzeichen versehene Ladungsverteilung im an Position 104 gespaltenen DnaB-Intein (Int^N: +6,2 und Int^C: -7,7) legt die Vermutung nahe, dass die Assoziation dieses Systems ebenfalls durch elektrostatische Wechselwirkungen begünstigt wird. Allerdings ließ sich dies nicht für das an Position 11 gesplattene DnaB-Intein bestätigen [317], weshalb von hydrophoben Wechselwirkungen als Initiator der Assoziation ausgegangen werden muss. Mit FRET-Messungen eines Paares aus dem grünen Fluoreszenzprotein (GFP) und Texas Red gelang es sogar dem Assoziationsprozess des DnaE-Intein ein biphasisches Verhalten zuzuordnen [349], d. h. einem schnellen Assoziationsvorgang mit einer konzentrationsabhängigen Geschwindigkeitskonstante $k_{on} = 2,8 \cdot 10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ folgt vermutlich eine Reorganisation der Proteinfaltung mit einer zweiten, konzentrationsunabhängigen Konstante erster Ordnung von $k_{2on} = 0,65 \text{ s}^{-1}$. Die Geschwindigkeitskonstante zweiter Ordnung der Gesamtassoziation von $k_{on} = 2,8 \cdot 10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ist 10^6 -mal höher als diejenige, die für das semisynthetische DnaB-Intein gemessen wurde [317]. In Kombination mit der ebenfalls um den Faktor 10^5 höheren Geschwindigkeitskonstante erster Ordnung von $k_{off} = 1,2 \text{ s}^{-1}$ der Dissoziation des DnaE-Komplexes wird eine nur 30-fach kleinere Dissoziationskonstante von 36 nM erreicht.

Erfolgreiche Protein-Fragment-Komplementierungen mit derart kurzen Teilstücken, wie sie das DnaB^N (1-11) beispielsweise liefert, sind selten in der Natur zu finden, da die Fragmente sehr leicht zur Aggregation und als Folge davon zur Unlöslichkeit neigen.

Da das Gegenstück zum in der Regel rekombinant hergestellten Protein relativ klein ist, wird das komplementäre Peptid interessant für die organische Synthese. So konnte die Fluoreszenz eines artifiziell gespaltenen GFP nach Zugabe eines 16 Aminosäure umfassenden C-terminalen Segmentes zum restlichen Protein, das aus 214 Aminosäuren besteht, wiederhergestellt werden [350]. Die zunächst inaktive β -Galaktosidase konnte durch externe Zugabe eines deletierten N-terminalen Fragmentes reaktiviert werden [351] und findet in der Kontrolle von Klonierungsarbeiten im „Blau/Weiß-Screen“ seine Anwendung. Ein weiteres Beispiel stellt die Entstehung der Ribonuklease S aus der A-Form dar [352]. Sie entsteht durch partiellen Verdau mit der Protease Subtilisin, woraufhin das 20 Aminosäuren große N-terminale S-Peptid sofort mit dem S-Protein assoziiert. Bromcyan-Spaltung ließ die Barnase, ein Protein mit Ribonuklease-Aktivität aus *Bacillus amyloliquefaciens*, in ein 22 Aminosäuren umfassendes Stück und ein Proteinfragment von Aminosäure 23 bis 110 zerfallen [353]. Zwar schien die Struktur der rekonstituierten Barnase richtig, jedoch konnten nur 10% der natürlichen Aktivität gemessen werden.

Für die letzten beiden Beispiele spontaner Protein-Fragment-Komplementierung ist genauso wie für das an Position 11 gespaltene DnaB-Intein die Dissoziationskonstante bestimmt worden. So liegt sie für das System der Ribonuklease S um den Faktor 25 kleiner bei 42 nM [354] verglichen mit derjenigen des Inteins von 1,1 μM [317]. Hingegen befindet sich der K_d -Wert der gespaltenen Barnase mit 3,1 μM in derselben Größenordnung [353]. Jedoch ist die Geschwindigkeitskonstante der Assoziation mit $0,8 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ um 4 Zehner-Potenzen größer als diejenige die für das DnaB-Intein ($16,8 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$) bestimmt wurde. Gerade diese Tatsache unterstreicht nochmals ausdrücklich die Schwierigkeiten die beim Spleißvorgang mit dem an Position 11 gespaltenen DnaB-Intein überwunden werden müssen und deren Minimierung ein Ziel der Proteinevolution mittels Phagen-Display sein könnte.

11.4. Ausblick zum Phagen-Display mit dem gespaltenen DnaB-Intein

11.4.1. Mögliche Verbesserungen des bestehenden Systems

Nicht nur im Hinblick auf die Nutzung des Intein-Spleißapparates zur Modifikation bestehender Phagenfusionsproteine, sondern auch für die Verbesserung der Spleißaktivität der beiden Varianten des künstlich gespaltenen *Ssp* DnaB-Inteins unter diversen Bedingungen (Salzkonzentration, pH-Wert, Temperatur, Zeit, denaturierende Reagenzien, etc.) durch Proteinevolution ist der zur Zeit erreichbare Anreicherungsfaktor nicht befriedigend. Zwar liegt er mit 3 (Phage **31** (DnaB^C (12-154))) bzw. 4 (Phage **16** (DnaB^C (107-154))) pro Biopanning-Schritt jenseits der Signifikanzgrenze für Anreicherungen von 2 [336] aber als ideal sind Faktoren von 10 anzusehen. Im Falle der Proteinevolution könnte der Anreicherungsfaktor auch besser ausfallen, sofern sich eine positive Mutation schnell durchsetzen kann. Weiterhin sind die Anreicherungsfaktoren statistisch mit hohen Fehlern behaftet. So zeigt eine Berechnung, dass für die Aussage $5\% \pm 2,5\%$ der untersuchten Plasmide richtig seien, bei einer Wahrscheinlichkeit von 95% bereits 292 Stichproben notwendig seien. Da aber in der Regel 150 bis maximal 300 Kolonien auf einer Agar-Platte noch gut auszählbar sind, müssten die Kolonien mindestens einer gesamten Platte analysiert werden, was nur mit großem Zeit und Arbeitsaufwand zu bewerkstelligen wäre. In diesem Zusammenhang wäre die Verwendung von Kolonien-PCR (engl. *colony PCR*) im Mikrotiterplatten-Format anstelle des Restriktionsverdaus eine sinnvolle Alternative. Diese Methode nutzt eine hochspezifische PCR aus, um Plasmide zu identifizieren, die ein bestimmtes Insert tragen.

Anstelle der Veränderung der Untersuchung der durch infizierte Bakterien gebildeten Kolonien zu einem Hochdurchsatz-Verfahren kann auch versucht werden, die Voraussetzungen für eine Spleißreaktion zu verbessern. Ein Ansatz in jene Richtung wäre die Erhöhung der Konzentration des zweiten, nicht phagegebundenen Spleißpartners in der räumlichen Nähe zum anderen phagegebundenen Fusionsprotein. Hierbei könnte man den Ansatz von Ando *et al.* adaptieren, die das DnaB^N (1-11) C-terminal über ein PEG-Verbindungsstück mit dem Liganden Trimethoprim verlängerten und andererseits das DnaB^C (12-154) N-terminal mit dem entsprechenden Rezeptor, der Dehydrofolatreduktase aus *E. coli*, fusionierten [355]. Durch die Bildung des Ligand/Rezeptor-Paares entsteht nun eine räumliche Nähe beider Spleißpartner, welche den Assoziationsprozess positiv beeinflussen sollte. Diese Herangehensweise sollte die ersten Runden der Proteinevolution erleichtern, müsste beim Fortschritt des Verfahrens allerdings wieder eingestellt werden, um statt auf Assoziation allein auf Assoziation und Spleißaktivität zu selektieren.

Eine Möglichkeit zur Verbesserung der Selektion des Spleißproduktes wäre durch die Fluoreszenz-aktivierte Zellsortierung (engl. *fluorescence activated cell sorting*, FACS) gegeben. Dazu müsste eine Fluorophor-markierte Variante des Pep2 (DTB-DnaB^N (1-11)) synthetisiert werden. Hierzu würde sich eine der beiden Lys-Seitenketten des N-Exteins nach Kupplung des Desthiobiotin anbieten. Die Verwendung von FACS würde vermutlich zu einer hohen Reduktion des Hintergrundsignals durch nicht spleißaktive natürliche Phagen führen.

Auch die Verringerung der unspezifischen Interaktionen mit der Phagenoberfläche könnten eine Verbesserung der Anreicherung spleißaktiver Phagen während der Proteinevolution mit sich bringen. In diesem Zusammenhang fällt das Augenmerk zuerst auf das Hüllprotein pVIII das ca. 99% der Oberfläche des Bakteriophagen M13 bildet. Das Protein pVIII besteht aus einer 50 Aminosäuren umfassenden α -Helix, die sich in drei Segmente gliedert [60]. Die Oberfläche des Phagen besteht aus dem N-terminalen Segment 1, das 4 negative Nettoladungen aufweist. Daher lagern sich an der Phagenoberfläche vorrangig positiv geladene Proteine unspezifisch an [356]. Andererseits sind 15 der 30 an der Phagenoberfläche zugänglichen Aminosäuren hydrophob, womit auch diese Wechselwirkungen unterstützt werden und zu den unspezifischen Anlagerungen beitragen. Mutationsstudien mit dem pVIII haben gezeigt, dass bis auf vier hydrophobe Aminosäuren, die für die Überlagerung der Hüllproteine nach dem Vorbild von Fischschuppen essentiell sind, alle übrigen der zugänglichen 30 Aminosäuren frei verändert werden können, ohne das negative Auswirkungen bezüglich der Struktur des Bakteriophagen auftreten [357]. So wurden an den Positionen der negativ geladenen Aminosäuren auch das positiv geladene Lys verzeichnet. Also könnte man ein pVIII evolvieren, das

weitestgehend unspezifische Assoziationen unterdrückt. In einem weniger aufwendigen Verfahren könnten auch die Ergebnisse der Arbeitsgruppe Weiss genutzt werden [356]. Sie nutzten Polylysinketten mit 16 bis 24 Gliedern in einem 200-fachen Überschuss bezogen auf die Phagenkonzentration um die negative Ladung abzuschirmen. Die Anwendbarkeit und Verbesserung des Phagen-Display durch Umhüllen der Phagenpartikel demonstrierten sie in der erfolgreichen Suche nach Peptiden für die Bindung an die oberflächlich positiv geladene DNase, die einen pI von 9,5 besitzt. Da für die Sequenz DnaB^N (1-104)-His₆ ebenfalls ein pI-Wert von 9,8 und das DnaB^N (1-11)-Fusionspeptid von ca. 6 berechnet werden kann, ist vor allem im Falle des Protein **24** (SBP-DnaB^N (1-104)), eine Nutzung der Umhüllung mit Polylysins es wert getestet zu werden. Allerdings muss in Vorversuchen geklärt werden, ob die hohe Polylysinkonzentration negative Einflüsse auf die Spleißreaktion besäße.

Im Bezug auf den als Negativ-Kontrolle eingesetzten Phagen sei darauf hingewiesen, dass dieser zwar mit 90% der Phagenpartikel beim monovalenten Phagen-Display weitgehend strukturell identisch ist, jedoch wäre hinsichtlich der katalytischen Aktivität des Inteins nur eine nicht spleißaktive z. B. N154A-Mutante auf der Phagenoberfläche eine echte Negativ-Kontrolle. Diese Mutante kann kein Spleißprodukt bilden, aber sie ist dennoch in der Lage mit dem Int^N-Protein bzw. Peptid zum Spleißkomplex zu assoziieren. Damit wird ein Teil des Int^N-Fragmentes aus dem Spleißprozess entfernt und der Druck auf den spleißaktiven Hybridphagen hinsichtlich eines schnellen, effektiven *trans*-Proteinspleißens erhöht. Außerdem ist der Anteil von 90% natürlichem M13-Phagen methodisch nicht zu umgehen und wird daher auch in Experimenten mit der anderen Negativ-Kontrolle weiterhin Einfluss auf die Spleißreaktion ausüben.

11.4.2. Alternative Phagen-Display-Strategien

11.4.2.1. Das oligovalente Phagen-Display

Interessant wäre eine Strategie, die die Vorteile des polyvalenten (mehrzahlige Präsentation des Fusionsproteins) mit denjenigen des monovalenten Phagen Display (bessere Transformation des Phagemidplasmids und bessere Infektiosität, da natürliches pIII vorhanden) verbindet. Eine solche Methode konnte im oligovalenten Phagen-Display verwirklicht werden. Für die Durchführung sind drei unterschiedliche Systeme entwickelt worden. Neben dem Hyperphage (Abbildung 104, [358]) sind das der Ex-Phage [359] und der Phaberge [360, 361].

Die beiden zu letzt genannten Systeme nutzen TAG-Stop-Kodons in der Sequenz des *pIII*-Gens des M13K07-Helferphagen (Ex-Phage: 2 (2-mal Glu in der 5'-Region mutiert); Phaberger: 1 (Gln350 mutiert)). Dadurch kann die Expression des *pIII* in nicht suppressierenden Bakterienstämmen verhindert werden, womit als alleinige Quelle für ein intaktes und damit auch infektiöses *pIII* das phagemidkodierte Fusionsprotein bleibt.

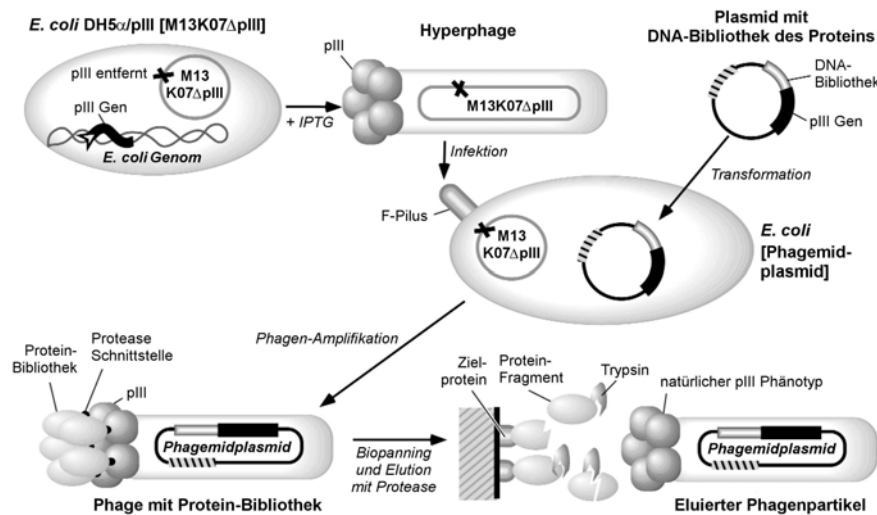


Abbildung 104. Ablauf eines Biopanningschritts bei Einsatz des Hyperphagen. Das *pIII*-Gen im Bakteriengenom ersetzt bei Induktion mit IPTG das im Helferphagen-genom deletierte Gen des Hüllproteins. Infizierte *E. coli*-Wirtszellen können nur intakte Phagen bilden, sofern Informationen des Hyperphage durch diejenigen des Phagemidplasmids komplettiert werden. Da alle *pIII* des gebildeten Phagenpartikels das interessierende Protein präsentieren, wird der Phage mit Trypsin eluiert, um den Phänotyp des natürlichen *pIII* und dessen hohe Infektiösität wiederherzustellen. (nach [358])

Der Hyperphage nutzt hingegen einen anderen Ansatz, um den alleinigen Einbau des Fusionsproteins in die Phagenpartikel zu gewährleisten. Die Produktion des Helferphagen erfolgt mit einer DH5α-Zelllinie, die integriert im Genom das Gen für das *pIII* unter Kontrolle eines starken Promotors besitzt. Auf der anderen Seite ist aus dem Genom des M13K07-Helferphagen das *pIII*-Gen deletiert worden, so dass nur bei Induktion der Expression von *pIII* intakte Helferphagen gebildet werden können. Zellen, die das Phagemidplasmid enthalten und mit dem M13K07ΔpIII-Helferphagen, dem Hyperphage, superinfiziert werden, verwenden zur Bildung vollständiger Phagenpartikel ausschließlich das phagemidkodierte *pIII*-Fusionsprotein. Um das Problem der verringerten Infektiösität des Fusionsproteins zu umgehen, werden die immobilisierten, erwünschten Phagen durch Trypsin-Verdau eluiert. Ein Vergleich aller drei Systeme hat gezeigt, dass der Hyperphage geringfügig verträglicher für *E. coli*-Zellen ist, sofern ein Antikörperfragment auf dem Phagen präsentiert wird [362]. Es wurde festgestellt, dass die relative Infektiösität der Phagenpartikel (d. h. die Fähigkeit eines durchschnittlichen Phagen eine *E. coli*-Testzelle zu infizieren), die nach den drei Verfahren produ-

ziert wurden, ähnlich war. Jedoch war der absolute Anteil infektiöser Hybridphagen bezogen auf eine Referenz von Phagenpartikel, die mit M13K07-Helferphagen produziert und deren Menge mit 100% gleichgesetzt wurde, deutlich unterschiedlich. So bildete der Ex-Phage 0,008% infektiöse Virionen im Bezug auf die Referenzphagenmenge, der Phaberge 0,05% und der Hyperphage 5%. Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass zuerst das Hyperphage-System auf das gespaltene DnaB-Intein angewandt werden sollte.

11.4.2.2. Polyvalentes Phagen-Display mit selektiv infektiösen Phagen

Die Methode der selektiv infektiösen Phagen (engl. *selectively-infective phage*, SIP [363]) könnte zu einer selektiven Infektiösität ausschließlich bei Phagen führen, die als Produkt aus dem Spleißvorgang hervorgegangen sind (Abbildung 105). Dazu müsste in einem polyvalenten Phagen-Display auf der Oberfläche ausschließlich das Fusionsprotein aus DnaB^C-Fragment und CT-Domäne des pIII präsentiert werden. Während des Spleißvorganges würde die CT-Domäne mit den für die Phageninfektiösität essentiellen N1 und N2-Domänen verbunden. Zwar würde die Transformationseffizienz aufgrund des größeren Phagenvektors verschlechtert, jedoch wäre wahrscheinlich keine Abtrennung der nicht phagegebundenen Spleißkomponente notwendig und außerdem entfielen die Immobilisierung der als Spleißprodukt erhaltenen Phagen mit den anschließenden Waschrufen.

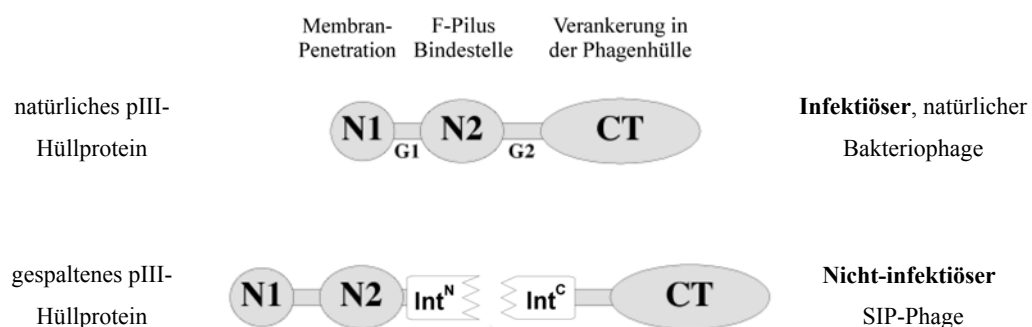


Abbildung 105. Vorschlag zur Verbesserung der Spleißaktivität des künstlich gespaltenen DnaB-Inteins unter Einbeziehung der Methode des selektiv infektiösen Phagen. Nur Phagen die erfolgreich die CT- mit der N1- und N2-Domäne des Hüllproteins pIII verbinden sind infektiös und können die Intein-kodierende Geninformation an die Wirtszelle weitergeben. Das Int^N-Fragment bildet mit der N1- und der N2-Domäne ein Fusionsprotein. Auf dem Phagen wird die Fusion aus Int^C-Fragment und CT-Domäne präsentiert.

Das System ließe sich im Prinzip auf beide Varianten des künstlich gespaltenen DnaB-Inteins anwenden, jedoch wäre eine Synthese im Falle der Int^N-Fusion des an Position 11 gespaltenen

Inteins aufgrund der Größe nicht mehr möglich, weshalb die Verwendung organisch chemischer Bausteine zumindest sehr stark erschwert würde.

11.4.3. Strategien zum Aufbau von DNA-Bibliotheken

Unabhängig von der vorstehend genannten Methode zur Verbesserung des Experiments besteht die Anforderung, dass auf der sogenannten *fitness landscape* [111] nicht nur zufällig gefundene lokale Maxima erforscht werden, sondern das globale Maximum (Abbildung 106). Auf die Proteinevolution von gespaltenen Inteinen übertragen bedeutet dies, dass bei jedem Experiment ein Gang durch den Sequenzraum der benutzten DNA-Bibliothek stattfindet. Während des Experimentes werden Inteine selektiert, die eine bestimmte Spleißaktivität (*fitness*) besitzen. Die Spleißaktivität der selektierten Inteine kann sowohl als gut bewertet werden (lokales Maximum) oder aber die Beste sein, die in der DNA-Bibliothek kodiert ist (globales Maximum).

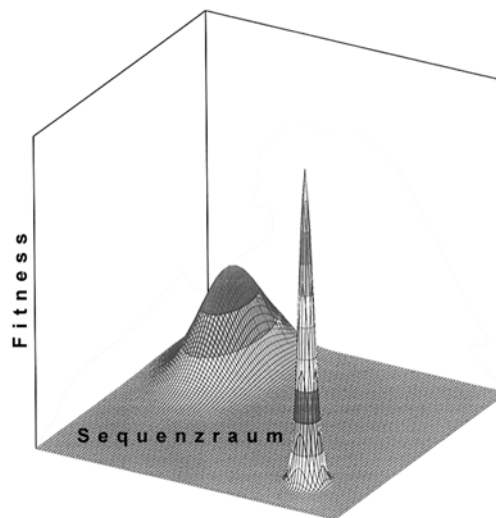


Abbildung 106. Für ein Proteinevolutions-Experiment denkbare *fitness landscape*. Bei Bewegung durch den Sequenzraum kann sowohl das lokale als auch das globale *fitness*-Maximum für die selektierten Proteine erreicht werden. Durch die große Fläche, die das lokale Maximum abdeckt, ist die Wahrscheinlichkeit es zu finden viel höher, als im Falle des globalen Maximums. (nach [111])

Von besonderer Wichtigkeit im Zusammenhang mit der *fitness landscape* ist die Gestaltung des Sequenzraumes der DNA-Bibliothek. Zwar kann in einem sogenannten *hard randomization*-Ansatz mit epPCR versucht werden, Aminosäuren in der Struktur der C-terminalen Inteinhälfte zu finden, die sich positiv auf die Gesamtstruktur im Hinblick auf den Spleiß- und/oder den Assoziationsvorgang auswirken. Jedoch wird dabei vernachlässigt, dass die

Spleißreaktion hochkonservierte Struktur motive des Inteins (siehe Kapitel 7.1) benötigt, die während der oben genannten Methode der direkten Proteinevolution zerstört werden können und somit eine große Population nicht spleißaktiver Inteine gebildet werden kann.

Deshalb sollte im Falle des DnaB^C-Inteins eher ein semirationaler Ansatz evtl. unter Einbeziehung der Kristallstruktur des Miniinteins [311] gewählt werden. Dabei sollten vorrangig die Gebiete außerhalb der Struktur motive verändert werden. Um dieses Ziel zu erreichen wäre der Einsatz gezielt platzierter, degenerierter Primer in einer rekursiven PCR denkbar, wie sie bereits im Projekt 1 dieser Doktorarbeit erfolgreich zum Aufbau der Bibliothek 2 genutzt wurde (siehe Kapitel 4.1.2 und 5.2.2). Die Durchmusterung der *fitness landscape* könnte z. B. in einem iterativen Ansatz [364] erfolgen. Auf eine Einteilung der zu mutierenden DNA-Sequenz in Abschnitte folgend, werden alle Abschnitte bis auf den ersten im ursprünglichen Zustand erhalten und dann erstmal das lokale Maximum gesucht. Daraufhin bleibt die erhaltene Basenfolge konstant und ausschließlich Abschnitt 2 wird verändert, um auch hier das lokale Maximum zu finden. Sollten die erhaltenen lokalen Maxima miteinander kooperieren, so sollte am Ende der Prozedur das globale Maximum stehen. Ist dies jedoch nicht der Fall, können Kombinationen der Sequenzen einzelner lokaler Maxima miteinander getestet werden. In jedem Fall blieben die fürs Spleißen essentiellen Struktur motive unberührt und lediglich ihre Einbettung in die Gesamtstruktur des Inteins würde verbessert.

11.5. Der Einfluss der Bibliothek an Position +2 auf die Spleißreaktion: Ein Vergleich mit dem *Ssp* DnaE-Intein

Die Arbeitsgruppe von Iwai hat den Einfluss der Aminosäure an Position +2 auf das Spleißverhalten des natürlich gespaltenen *Ssp* DnaE-Intein untersucht [291]. Beim DnaE-Intein wird ein Phe ersetzt, im Falle des künstlich gespaltenen DnaB-Inteins befindet sich an dieser Position die Aminosäure Ile. Hinsichtlich der Vergleichbarkeit der Ausbeuten an Spleißprodukt müssen die unterschiedlichen Durchführungen der Experimente beachtet werden. Die Expression beider Proteine des DnaE wurde mit Arabinose (C-Terminus) bzw. IPTG (N-Terminus) induziert und anschließend die Spleißreaktion für 6 h innerhalb der Zelle durchgeführt. Dem Aufschluss der Zellen folgte eine Aufreinigung des Spleißproduktes mit Ni-Affinitätschromatographie. Im Gegensatz dazu bestand der Spleißansatz dieser Arbeit aus aufgereinigten Proteinen, die *in vitro* miteinander 24 h inkubiert wurden. Bezogen auf die Intensität der

Bande des Spleißpartners mit DnaB^C (107-154) wurde die Ausbeute der Reaktion mit Hilfe eines SDS-Gels densitometrisch bestimmt.

Bevor die beiden Inteine miteinander verglichen werden, sollten zunächst die Auswirkungen der Bibliothek an Position +2 auf das DnaE-Intein betrachtet werden (Tabelle 10). Mit der natürlicherweise an Position +2 befindlichen Aminosäure Phe ist eine Effizienz der Spleißproduktbildung von 75% zu verzeichnen. Im Rahmen der Messfehler ist dies gleichbedeutend mit derjenigen von Tyr. Aber bereits Trp zeigt nur noch 48% Effizienz und die nächst besseren Aminosäuren His und Met besitzen nur noch einen Wert von ca. 11%. Nun fällt die Effizienz von Ile (7%) über Ala, Leu, Thr, Asn, Cys und Val bis Ser auf 2% ab und schließlich war für Gln, Glu, Asp, Gly, Arg, Lys und Pro kein Spleißprodukt detektierbar. Daraus muss geschlussfolgert werden, dass zumindest *in vivo* die Struktur des DnaE-Spleißkomplexes vorrangig nach einer großen, aromatischen Aminosäure wie Phenylalanin oder Tyrosin an Position +2 verlangt.

Tabelle 10. Vergleich des prozentual gebildeten Spleißproduktes für das *Ssp* DnaB- und DnaE-Intein in Abhängigkeit der Aminosäure an Position +2

Aminosäure an Position +2 (DnaB: Ile; DnaE: Phe)	gebildetes Spleißprodukt des <i>Ssp</i> DnaB-Intein (nach 24 h <i>in vitro</i> -spleißen)	gebildetes Spleißprodukt des <i>Ssp</i> DnaE-Intein* (nach 6 h <i>in vivo</i> -spleißen)
Ala	33%	5%
Glu	24%	n.d.
Ile	40%	7%
Lys	26%	n.d.
Leu	11%	4%
Pro	9%	n.d.
Gln	26%	n.d.
Trp	25%	48%
Tyr	23%	78%

(n.d.: nicht detektiert; Informationen zum DnaE-Intein nach [291])

In jener Hinsicht scheint das DnaB-Intein an Position +2 insgesamt etwas toleranter zu sein. Zwar ist die Spleißausbeute der natürlich dort vorkommenden Aminosäure Ile am höchsten (40%), jedoch zeigen 6 weitere der 9 untersuchten Aminosäuren eine Spleißausbeute von ca. 25% oder mehr (Ala, Glu, Lys, Gln, Trp und Tyr). Sowohl beim DnaE-Intein als auch beim DnaB-Intein sind somit die besten Spleißausbeuten mit den natürlich an Position +2 vorkommenden Aminosäuren zu erzielen. Hingegen ist der Wert der beim DnaB-Intein nächst bes-

seren Aminosäure Ala 6 Mal höher als beim DnaE-Intein (33% zu 5%). Deshalb sind weitere Untersuchungen mit der Ala- und evtl. einer Gly-Mutante notwendig. Bei beiden Inteinen gleich ist die Tatsache, dass Pro oder Leu an Position +2 zu schlechten Ausbeuten an Spleißprodukt führen. Dieser Trend kann für Pro +2 mit einer weiteren Literaturstelle unterstützt werden [365]. So zeigte eine Mutante des *Ssp* DnaB-Intein mit Pro+2 bei *in vivo trans*-Spleißreaktionen bei 15°C keine Produktbildung nach 16 h, die mit einem Coomassie gefärbten SDS-Gel nachweisbar wäre.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass effektives *trans*-Proteinspleißen sowohl *in vivo* als auch *in vitro* sehr stark davon abhängt, wie gut sich die zu verbindenden Exteine über die Gesamtstruktur des Inteins und der nachfolgenden Spleißkomplexe einander annäher können. Dabei scheinen die Aminosäuren in der Nähe der Spleißposition von entscheidender Bedeutung zu sein, wobei gilt, je näher sich die Aminosäure an der Spaltstelle befindet, desto wichtiger fällt vermutlich ihr Beitrag aus. Diese These untermauern zwei Tatsachen, zum einen sind ähnlich gute Spleißausbeuten, wie beim Intein-Fragment mit dem natürlich sich an Position +2 befindlichen Ile, vorrangig mit räumlich ähnlich aufgebauten Aminosäuren erreichbar und zum anderen wirkt sich die strukturbrechende Eigenschaft des Pro negativ auf die Ausbeuten der Spleißreaktion aus.

Ausblick

Die positiven Auswirkungen der Aminosäure Ala an Position +2 sollten mit einer Gly- und evtl Ser-Mutante näher untersucht und verifiziert werden. Im Hinblick auf weitere Studien würde die Modifikation des Proteins **40L** mit einem zusätzlichen C-terminalen Affinitäts-Tag die Protein-Aufreinigung vereinfachen. Schließlich wäre auch eine Analyse der +2 Position beim DnaB^C (12-154) ein lohnenswertes Ziel. Hierbei wäre auch von Vorteil, dass Untersuchungen gezeigt haben, dass durch die vermutlich bessere Vorfaltung des C-terminalen Fragmentes und entsprechende Konzentrationen der Spleißpartner Ausbeuten an Spleißprodukt von bis zu 70% möglich sind [317].

12. Literaturverzeichnis

1. W. Paley, *Natural Theology*. 1802.
2. C. Darwin, *On the Origin of Species by Means of Natural Selection or the Preservation of Favoured Races in the Struggle for Life*. 1859.
3. R. Dawkins, *The Blind Watchmaker*. 1986. Longmans (London).
4. D. Rothlisberger et al., *Kemp elimination catalysts by computational enzyme design*. *Nature*, 2008. **453** (7192): 190-5.
5. A. Aharoni et al., *The 'evolvability' of promiscuous protein functions*. *Nat Genet*, 2005. **37** (1): 73-6.
6. L. Riechmann et al., *Reshaping human antibodies for therapy*. *Nature*, 1988. **332** (6162): 323-7.
7. M. A. Dwyer et al., *Computational design of a biologically active enzyme*. *Science*, 2004. **304** (5679): 1967-71.
8. H. S. Park et al., *Design and evolution of new catalytic activity with an existing protein scaffold*. *Science*, 2006. **311** (5760): 535-8.
9. M. Schold et al., *Oligonucleotide-directed mutagenesis using plasmid DNA templates and two primers*. *DNA*, 1984. **3** (6): 469-77.
10. J. Braman et al., *Site-directed mutagenesis using double-stranded plasmid DNA templates*. *Methods Mol Biol*, 1996. **57**: 31-44.
11. D. W. Leung et al., *A method for random mutagenesis of a defined DNA segment using a modified polymerase chain reaction*. *Technique*, 1989. **1**: 11-15.
12. Y. H. Zhou et al., *Random mutagenesis of gene-sized DNA molecules by use of PCR with Taq DNA polymerase*. *Nucleic Acids Res*, 1991. **19** (21): 6052.
13. R. C. Cadwell und G. F. Joyce, *Randomization of genes by PCR mutagenesis*. *PCR Methods Appl*, 1992. **2** (1): 28-33.
14. R. C. Cadwell und G. F. Joyce, *Mutagenic PCR*. 1995. S. 583-89. Aus: *PCR Primer: A Laboratory Manual* (C. W. Dieffenbach und G. S. Dveksler, Ed(n)). CSHL Press (New York).
15. M. Zaccolo et al., *An approach to random mutagenesis of DNA using mixtures of triphosphate derivatives of nucleoside analogues*. *J Mol Biol*, 1996. **255** (4): 589-603.
16. S. Claveau et al., *Alcohol-mediated error-prone PCR*. *DNA Cell Biol*, 2004. **23** (11): 789-95.
17. Stratagene (La Jolla), *GeneMorph II Random Mutagenesis Kit* (Handbuch), 2003.
18. N. J. Turner, *Directed evolution of enzymes for applied biocatalysis*. *Trends Biotechnol*, 2003. **21** (11): 474-8.
19. W. P. Stemmer, *DNA shuffling by random fragmentation and reassembly: in vitro recombination for molecular evolution*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1994. **91** (22): 10747-51.
20. W. P. Stemmer, *Rapid evolution of a protein in vitro by DNA shuffling*. *Nature*, 1994. **370** (6488): 389-91.
21. J. F. Chaparro-Riggers et al., *Revealing biases inherent in recombination protocols*. *BMC Biotechnol*, 2007. **7**: 77.
22. J. D. Bloom et al., *Evolving strategies for enzyme engineering*. *Curr Opin Struct Biol*, 2005. **15** (4): 447-52.
23. B. F. Binkowski et al., *Correcting errors in synthetic DNA through consensus shuffling*. *Nucleic Acids Res*, 2005. **33** (6): e55.
24. H. Zhao et al., *Molecular evolution by staggered extension process (StEP) in vitro recombination*. *Nat Biotechnol*, 1998. **16** (3): 258-61.
25. H. Zhao, *Staggered Extension Process (StEP) In vitro DNA Recombination*. 2004. S. 42-49. Aus: *Methods in Enzymology* Vol. 388. (D. E. Robertson und J. P. Noel, Ed(n)). Elsevier Inc. (New York).
26. M. Ostermeier et al., *Incremental truncation as a strategy in the engineering of novel biocatalysts*. *Bioorg Med Chem*, 1999. **7** (10): 2139-44.
27. M. Ostermeier et al., *A combinatorial approach to hybrid enzymes independent of DNA homology*. *Nat Biotechnol*, 1999. **17** (12): 1205-9.
28. S. Lutz et al., *Rapid generation of incremental truncation libraries for protein engineering using alpha-phosphothioate nucleotides*. *Nucleic Acids Res*, 2001. **29** (4): e16.
29. S. Lutz et al., *Creating multiple-crossover DNA libraries independent of sequence identity*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2001. **98** (20): 11248-53.
30. V. Sieber et al., *Libraries of hybrid proteins from distantly related sequences*. *Nat Biotechnol*, 2001. **19** (5): 456-60.
31. K. M. Müller et al., *Nucleotide exchange and excision technology (NExT) DNA shuffling: a robust method for DNA fragmentation and directed evolution*. *Nucleic Acids Res*, 2005. **33** (13): e117.
32. T. Matsuura und T. Yomo, *In vitro evolution of proteins*. *J Biosci Bioeng*, 2006. **101** (6): 449-56.

33. D. S. Tawfik und A. D. Griffiths, *Man-made cell-like compartments for molecular evolution*. Nat Biotechnol, 1998. **16** (7): 652-6.
34. A. Sepp et al., *Microbead display by in vitro compartmentalisation: selection for binding using flow cytometry*. FEBS Lett, 2002. **532** (3): 455-8.
35. A. D. Griffiths und D. S. Tawfik, *Directed evolution of an extremely fast phosphotriesterase by in vitro compartmentalization*. Embo J, 2003. **22** (1): 24-35.
36. A. Aharoni et al., *High-throughput screening of enzyme libraries: thiolactonases evolved by fluorescence-activated sorting of single cells in emulsion compartments*. Chem Biol, 2005. **12** (12): 1281-9.
37. E. Mastrobattista et al., *High-throughput screening of enzyme libraries: in vitro evolution of a beta-galactosidase by fluorescence-activated sorting of double emulsions*. Chem Biol, 2005. **12** (12): 1291-300.
38. F. J. Ghadessy et al., *Directed evolution of polymerase function by compartmentalized self-replication*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98** (8): 4552-7.
39. F. J. Ghadessy et al., *Generic expansion of the substrate spectrum of a DNA polymerase by directed evolution*. Nat Biotechnol, 2004. **22** (6): 755-9.
40. K. Bernath et al., *Directed evolution of protein inhibitors of DNA-nucleases by in vitro compartmentalization (IVC) and nano-droplet delivery*. J Mol Biol, 2005. **345** (5): 1015-26.
41. A. V. Pietrini und P. L. Luisi, *Cell-free protein synthesis through solubilisation exchange in water/oil emulsion compartments*. Chembiochem, 2004. **5** (8): 1055-62.
42. A. D. Griffiths und D. S. Tawfik, *Miniaturising the laboratory in emulsion droplets*. Trends Biotechnol, 2006. **24** (9): 395-402.
43. L. C. Mattheakis et al., *An in vitro polysome display system for identifying ligands from very large peptide libraries*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1994. **91** (19): 9022-6.
44. J. Hanes und A. Pluckthun, *In vitro selection and evolution of functional proteins by using ribosome display*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1997. **94** (10): 4937-42.
45. H. Lin und V. W. Cornish, *Screening- und Selektionsmethoden für die Analyse von Proteinfunktionen in großem Maßstab*. Angew Chem, 2002. **114** (23): 4580-606.
46. N. Nemoto et al., *In vitro virus: bonding of mRNA bearing puromycin at the 3'-terminal end to the C-terminal end of its encoded protein on the ribosome in vitro*. FEBS Lett, 1997. **414** (2): 405-8.
47. R. W. Roberts und J. W. Szostak, *RNA-peptide fusions for the in vitro selection of peptides and proteins*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1997. **94** (23): 12297-302.
48. M. Kurz et al., *Psoralen photo-crosslinked mRNA-puromycin conjugates: a novel template for the rapid and facile preparation of mRNA-protein fusions*. Nucleic Acids Res, 2000. **28** (18): e83.
49. J. A. Francisco et al., *Transport and anchoring of beta-lactamase to the external surface of Escherichia coli*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1992. **89** (7): 2713-7.
50. J. A. Francisco et al., *Production and fluorescence-activated cell sorting of Escherichia coli expressing a functional antibody fragment on the external surface*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1993. **90** (22): 10444-8.
51. E. T. Boder und K. D. Wittrup, *Yeast surface display for screening combinatorial polypeptide libraries*. Nat Biotechnol, 1997. **15** (6): 553-7.
52. P. Ellmark et al., *A novel mammalian display system for the selection of protein-protein interactions by decoy receptor engagement*. J Mol Recognit, 2004. **17** (4): 316-22.
53. R. R. Beerli et al., *Isolation of human monoclonal antibodies by mammalian cell display*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105** (38): 14336-41.
54. G. Georgiou et al., *Practical applications of engineering gram-negative bacterial cell surfaces*. Trends Biotechnol, 1993. **11** (1): 6-10.
55. R. Schier et al., *Isolation of high-affinity monomeric human anti-c-erbB-2 single chain Fv using affinity-driven selection*. J Mol Biol, 1996. **255** (1): 28-43.
56. B. K. Cho et al., *A yeast surface display system for the discovery of ligands that trigger cell activation*. J Immunol Methods, 1998. **220** (1-2): 179-88.
57. U. Schonbeck und P. Libby, *The CD40/CD154 receptor/ligand dyad*. Cell Mol Life Sci, 2001. **58** (1): 4-43.
58. G. P. Smith, *Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface*. Science, 1985. **228** (4705): 1315-7.
59. W. G. Willats, *Phage display: practicalities and prospects*. Plant Mol Biol, 2002. **50** (6): 837-54.
60. D. A. Marvin et al., *Molecular models and structural comparisons of native and mutant class I filamentous bacteriophages Ff (fd, fl, M13), If1 and IKE*. J Mol Biol, 1994. **235** (1): 260-86.
61. M. Russel et al., *Introduction to phage biology and phage display*. 2004. Aus: *Phage Display - A Practical Approach* (T. Clackson und H. B. Lowman, Ed(n)). Oxford University Press (Oxford, New York).

62. P. Holliger et al., *Crystal structure of the two N-terminal domains of g3p from filamentous phage fd at 1.9 Å: evidence for conformational lability*. J Mol Biol, 1999. **288** (4): 649-57.
63. B. Eckert et al., *Prolyl isomerization as a molecular timer in phage infection*. Nat Struct Mol Biol, 2005. **12** (7): 619-23.
64. L. W. Deng et al., *Interaction of the globular domains of pIII protein of filamentous bacteriophage fd with the F-pilus of Escherichia coli*. Virology, 1999. **253** (2): 271-7.
65. L. W. Deng und R. N. Perham, *Delineating the site of interaction on the pIII protein of filamentous bacteriophage fd with the F-pilus of Escherichia coli*. J Mol Biol, 2002. **319** (3): 603-14.
66. B. Eckert und F. X. Schmid, *A conformational unfolding reaction activates phage fd for the infection of Escherichia coli*. J Mol Biol, 2007. **373** (2): 452-61.
67. I. Stengele et al., *Dissection of functional domains in phage fd adsorption protein. Discrimination between attachment and penetration sites*. J Mol Biol, 1990. **212** (1): 143-9.
68. E. M. Click und R. E. Webster, *Filamentous phage infection: required interactions with the TolA protein*. J Bacteriol, 1997. **179** (20): 6464-71.
69. L. Riechmann und P. Holliger, *The C-terminal domain of TolA is the coreceptor for filamentous phage infection of E. coli*. Cell, 1997. **90** (2): 351-60.
70. A. Martin und F. X. Schmid, *A proline switch controls folding and domain interactions in the gene-3-protein of the filamentous phage fd*. J Mol Biol, 2003. **331** (5): 1131-40.
71. J. McCafferty et al., *Phage-enzymes: expression and affinity chromatography of functional alkaline phosphatase on the surface of bacteriophage*. Protein Eng, 1991. **4** (8): 955-61.
72. M. Widersten und B. Mannervik, *Glutathione transferases with novel active sites isolated by phage display from a library of random mutants*. J Mol Biol, 1995. **250** (2): 115-22.
73. J. Light und R. A. Lerner, *Random mutagenesis of staphylococcal nuclease and phage display selection*. Bioorg Med Chem, 1995. **3** (7): 955-67.
74. L. O. Hansson et al., *Mechanism-based phage display selection of active-site mutants of human glutathione transferase A1-1 catalyzing SNAr reactions*. Biochemistry, 1997. **36** (37): 11252-60.
75. L. O. Hansson et al., *An approach to optimizing the active site in a glutathione transferase by evolution in vitro*. Biochem J, 1999. **344 Pt 1**: 93-100.
76. M. A. Ator und P. R. Ortiz de Montellano, *Mechanism-based (suicide) enzyme inactivation*. 1990. S. 213-82. Aus: *Enzymes (Vol. 19)* (D. S. Sigman und P. D. Boyer, Ed(n)). Academic Press (San Diego).
77. P. Soumilion et al., *Selection of beta-lactamase on filamentous bacteriophage by catalytic activity*. J Mol Biol, 1994. **237** (4): 415-22.
78. S. Vanwetswinkel et al., *Selection of the most active enzymes from a mixture of phage-displayed β -lactamase mutants*. Bioorg Med Chem Lett, 1996. **6** (7): 789-92.
79. K. D. Janda et al., *Chemical selection for catalysis in combinatorial antibody libraries*. Science, 1997. **275** (5302): 945-8.
80. F. Tanaka et al., *Catalytic single-chain antibodies possessing β -lactamase activity selected from a phage displayed combinatorial library using a mechanism-based inhibitor*. Tetrahedron Lett, 1999. **40** (46): 8063-6.
81. S. Vanwetswinkel et al., *Selection of beta-lactamases and penicillin binding mutants from a library of phage displayed TEM-1 beta-lactamase randomly mutated in the active site omega-loop*. J Mol Biol, 2000. **295** (3): 527-40.
82. S. Cesaro-Tadic et al., *Turnover-based in vitro selection and evolution of biocatalysts from a fully synthetic antibody library*. Nat Biotechnol, 2003. **21** (6): 679-85.
83. H. Pedersen et al., *A method for directed evolution and functional cloning of enzymes*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95** (18): 10523-8.
84. S. Atwell und J. A. Wells, *Selection for improved subtiligases by phage display*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96** (17): 9497-502.
85. S. Demartis et al., *A strategy for the isolation of catalytic activities from repertoires of enzymes displayed on phage*. J Mol Biol, 1999. **286** (2): 617-33.
86. J.-L. Jestin et al., *Eine Methode zur Selektion katalytischer Aktivität, die Phagendisplay und Nachbarschaftseffekte nutzt*. Angew Chem, 1999. **111** (8): 1196-200.
87. C. Heinis et al., *Selection of catalytically active biotin ligase and trypsin mutants by phage display*. Protein Eng, 2001. **14** (12): 1043-52.
88. I. Ponsard et al., *Selection of metalloenzymes by catalytic activity using phage display and catalytic elution*. Chembiochem, 2001. **2** (4): 253-9.
89. B. Krebs et al., *High-throughput generation and engineering of recombinant human antibodies*. J Immunol Methods, 2001. **254** (1-2): 67-84.
90. R. E. Hawkins et al., *Selection of phage antibodies by binding affinity. Mimicking affinity maturation*. J Mol Biol, 1992. **226** (3): 889-96.

91. B. L. Roberts et al., *Directed evolution of a protein: selection of potent neutrophil elastase inhibitors displayed on M13 fusion phage*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1992. **89** (6): 2429-33.
92. J. Ku und P. G. Schultz, *Alternate protein frameworks for molecular recognition*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1995. **92** (14): 6552-6.
93. Y. Chen et al., *Selection and analysis of an optimized anti-VEGF antibody: crystal structure of an affinity-matured Fab in complex with antigen*. J Mol Biol, 1999. **293** (4): 865-81.
94. M. S. Dennis et al., *Peptide exosite inhibitors of factor VIIa as anticoagulants*. Nature, 2000. **404** (6777): 465-70.
95. W. J. Fairbrother et al., *Novel peptides selected to bind vascular endothelial growth factor target the receptor-binding site*. Biochemistry, 1998. **37** (51): 17754-64.
96. H. B. Lowman et al., *Molecular mimics of insulin-like growth factor 1 (IGF-1) for inhibiting IGF-1: IGF-binding protein interactions*. Biochemistry, 1998. **37** (25): 8870-8.
97. B. Ruan et al., *Stabilizing the subtilisin BPN' pro-domain by phage display selection: how restrictive is the amino acid code for maximum protein stability?* Protein Sci, 1998. **7** (11): 2345-53.
98. R. J. Goodson et al., *High-affinity urokinase receptor antagonists identified with bacteriophage peptide display*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1994. **91** (15): 7129-33.
99. C. Gao et al., *Making artificial antibodies: a format for phage display of combinatorial heterodimeric arrays*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96** (11): 6025-30.
100. A. A. Il'ichev et al., *Production of a viable variant of the M13 phage with a foreign peptide inserted into the basic coat protein*. Dokl Akad Nauk SSSR, 1989. **307** (2): 481-3.
101. L. S. Jespers et al., *Surface expression and ligand-based selection of cDNAs fused to filamentous phage gene VI*. Biotechnology (N Y), 1995. **13** (4): 378-82.
102. S. Bass et al., *Hormone phage: an enrichment method for variant proteins with altered binding properties*. Proteins, 1990. **8** (4): 309-14.
103. R. Cramer und M. Suter, *Display of biologically active proteins on the surface of filamentous phages: a cDNA cloning system for selection of functional gene products linked to the genetic information responsible for their production*. Gene, 1993. **137** (1): 69-75.
104. S. F. Parmley und G. P. Smith, *Antibody-selectable filamentous fd phage vectors: affinity purification of target genes*. Gene, 1988. **73** (2): 305-18.
105. S. E. Cwirla et al., *Peptides on phage: a vast library of peptides for identifying ligands*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1990. **87** (16): 6378-82.
106. J. K. Scott und G. P. Smith, *Searching for peptide ligands with an epitope library*. Science, 1990. **249** (4967): 386-90.
107. S. J. McConnell und R. H. Hoess, *Tendamistat as a scaffold for conformationally constrained phage peptide libraries*. J Mol Biol, 1995. **250** (4): 460-70.
108. M. A. McLafferty et al., *M13 bacteriophage displaying disulfide-constrained microproteins*. Gene, 1993. **128** (1): 29-36.
109. C. F. Barbas, 3rd et al., *Assembly of combinatorial antibody libraries on phage surfaces: the gene III site*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1991. **88** (18): 7978-82.
110. A. S. Kang et al., *Linkage of recognition and replication functions by assembling combinatorial antibody Fab libraries along phage surfaces*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1991. **88** (10): 4363-6.
111. G. P. Smith und V. A. Petrenko, *Phage Display*. Chem Rev, 1997. **97** (2): 391-410.
112. S. P. Lei et al., *Characterization of the Erwinia carotovora pelB gene and its product pectate lyase*. J Bacteriol, 1987. **169** (9): 4379-83.
113. D. Steiner et al., *Signal sequences directing cotranslational translocation expand the range of proteins amenable to phage display*. Nat Biotechnol, 2006. **24** (7): 823-31.
114. J. D. Boeke et al., *Effects of bacteriophage f1 gene III protein on the host cell membrane*. Mol Gen Genet, 1982. **186** (2): 185-92.
115. H. B. Lowman et al., *Selecting high-affinity binding proteins by monovalent phage display*. Biochemistry, 1991. **30** (45): 10832-8.
116. W. Ernst et al., *Baculovirus surface display: construction and screening of a eukaryotic epitope library*. Nucleic Acids Res, 1998. **26** (7): 1718-23.
117. R. Grabherr et al., *Developments in the use of baculoviruses for the surface display of complex eukaryotic proteins*. Trends Biotechnol, 2001. **19** (6): 231-6.
118. R. Grabherr et al., *Expression of foreign proteins on the surface of Autographa californica nuclear polyhedrosis virus*. Biotechniques, 1997. **22** (4): 730-5.
119. S. Fields und O. Song, *A novel genetic system to detect protein-protein interactions*. Nature, 1989. **340** (6230): 245-6.
120. J. Ma und M. Ptashne, *Converting a eukaryotic transcriptional inhibitor into an activator*. Cell, 1988. **55** (3): 443-6.

121. R. Brent und M. Ptashne, *A eukaryotic transcriptional activator bearing the DNA specificity of a prokaryotic repressor*. Cell, 1985. **43** (3 Pt 2): 729-36.
122. T. Durfee et al., *The retinoblastoma protein associates with the protein phosphatase type 1 catalytic subunit*. Genes Dev, 1993. **7** (4): 555-69.
123. J. Gyuris et al., *Cdi1, a human G1 and S phase protein phosphatase that associates with Cdk2*. Cell, 1993. **75** (4): 791-803.
124. C. von Mering et al., *Comparative assessment of large-scale data sets of protein-protein interactions*. Nature, 2002. **417** (6887): 399-403.
125. H. Huang et al., *Where have all the interactions gone? Estimating the coverage of two-hybrid protein interaction maps*. PLoS Comput Biol, 2007. **3** (11): e214.
126. I. Stagljar et al., *A genetic system based on split-ubiquitin for the analysis of interactions between membrane proteins in vivo*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95** (9): 5187-92.
127. N. Johnsson und A. Varshavsky, *Split ubiquitin as a sensor of protein interactions in vivo*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1994. **91** (22): 10340-4.
128. N. Mockli et al., *Yeast split-ubiquitin-based cytosolic screening system to detect interactions between transcriptionally active proteins*. Biotechniques, 2007. **42** (6): 725-30.
129. M. C. Wehr et al., *Monitoring regulated protein-protein interactions using split TEV*. Nat Methods, 2006. **3** (12): 985-93.
130. S. Eyckerman et al., *Design and application of a cytokine-receptor-based interaction trap*. Nat Cell Biol, 2001. **3** (12): 1114-9.
131. B. Suter et al., *Two-hybrid technologies in proteomics research*. Curr Opin Biotechnol, 2008. **19** (4): 316-23.
132. M. Caligiuri et al., *MASBIT: three-hybrid trap for quantitative proteome fingerprinting of small molecule-protein interactions in mammalian cells*. Chem Biol, 2006. **13** (7): 711-22.
133. P. Youderian et al., *Changing the DNA-binding specificity of a repressor*. Cell, 1983. **35** (3 Pt 2): 777-83.
134. S. L. Dove et al., *Activation of prokaryotic transcription through arbitrary protein-protein contacts*. Nature, 1997. **386** (6625): 627-30.
135. M. A. Osborne et al., *The yeast tribrid system--genetic detection of trans-phosphorylated ITAM-SH2-interactions*. Biotechnology (N Y), 1995. **13** (13): 1474-8.
136. M. A. Osborne et al., *The inositol 5'-phosphatase SHIP binds to immunoreceptor signaling motifs and responds to high affinity IgE receptor aggregation*. J Biol Chem, 1996. **271** (46): 29271-8.
137. J. Zhang und S. Lautar, *A yeast three-hybrid method to clone ternary protein complex components*. Anal Biochem, 1996. **242** (1): 68-72.
138. B. A. Ozenberger und K. H. Young, *Functional interaction of ligands and receptors of the hematopoietic superfamily in yeast*. Mol Endocrinol, 1995. **9** (10): 1321-9.
139. W. Van Crielinge und R. Beyaert, *Yeast Two-Hybrid: State of the Art*. Biol Proced Online, 1999. **2**: 1-38.
140. U. Putz et al., *A tri-hybrid system for the analysis and detection of RNA--protein interactions*. Nucleic Acids Res, 1996. **24** (23): 4838-40.
141. D. J. SenGupta et al., *A three-hybrid system to detect RNA-protein interactions in vivo*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. **93** (16): 8496-501.
142. E. J. Licitra und J. O. Liu, *A three-hybrid system for detecting small ligand-protein receptor interactions*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. **93** (23): 12817-21.
143. K. Baker et al., *An optimized dexamethasone-methotrexate yeast 3-hybrid system for high-throughput screening of small molecule-protein interactions*. Anal Biochem, 2003. **315** (1): 134-7.
144. M. Vidal et al., *Reverse two-hybrid and one-hybrid systems to detect dissociation of protein-protein and DNA-protein interactions*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. **93** (19): 10315-20.
145. M. Vidal et al., *Genetic characterization of a mammalian protein-protein interaction domain by using a yeast reverse two-hybrid system*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. **93** (19): 10321-6.
146. J. Huang und S. L. Schreiber, *A yeast genetic system for selecting small molecule inhibitors of protein-protein interactions in nanodroplets*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1997. **94** (25): 13396-401.
147. J. D. Boeke et al., *A positive selection for mutants lacking orotidine-5'-phosphate decarboxylase activity in yeast: 5-fluoro-orotic acid resistance*. Mol Gen Genet, 1984. **197** (2): 345-6.
148. S. Eyckerman et al., *Reverse MAPPIT: screening for protein-protein interaction modifiers in mammalian cells*. Nat Methods, 2005. **2** (6): 427-33.
149. R. L. Finley, Jr. und R. Brent, *Interaction mating reveals binary and ternary connections between Drosophila cell cycle regulators*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1994. **91** (26): 12980-4.
150. P. Uetz et al., *A comprehensive analysis of protein-protein interactions in Saccharomyces cerevisiae*. Nature, 2000. **403** (6770): 623-7.

151. T. Ito et al., *A comprehensive two-hybrid analysis to explore the yeast protein interactome*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98** (8): 4569-74.
152. P. J. Lupardus et al., *Small molecule-induced allosteric activation of the Vibrio cholerae RTX cysteine protease domain*. Science, 2008. **322** (5899): 265-8.
153. J. Choi et al., *Structure of the FKBP12-rapamycin complex interacting with the binding domain of human FRAP*. Science, 1996. **273** (5272): 239-42.
154. R. F. Standaert et al., *Molecular cloning and overexpression of the human FK506-binding protein FKBP*. Nature, 1990. **346** (6285): 671-4.
155. E. J. Brown et al., *A mammalian protein targeted by G1-arresting rapamycin-receptor complex*. Nature, 1994. **369** (6483): 756-8.
156. V. M. Rivera et al., *A humanized system for pharmacologic control of gene expression*. Nat Med, 1996. **2** (9): 1028-32.
157. J. J. Kohler und C. R. Bertozzi, *Regulating cell surface glycosylation by small molecule control of enzyme localization*. Chem Biol, 2003. **10** (12): 1303-11.
158. J. J. Kohler et al., *Directing flux in glycan biosynthetic pathways with a small molecule switch*. Chembiochem, 2004. **5** (10): 1455-8.
159. H. D. Mootz und T. W. Muir, *Protein splicing triggered by a small molecule*. J Am Chem Soc, 2002. **124** (31): 9044-5.
160. H. D. Mootz et al., *Conditional protein splicing: a new tool to control protein structure and function in vitro and in vivo*. J Am Chem Soc, 2003. **125** (35): 10561-9.
161. B. A. Griffin et al., *Specific covalent labeling of recombinant protein molecules inside live cells*. Science, 1998. **281** (5374): 269-72.
162. S. R. Adams et al., *New biarsenical ligands and tetracysteine motifs for protein labeling in vitro and in vivo: synthesis and biological applications*. J Am Chem Soc, 2002. **124** (21): 6063-76.
163. X. Y. Zhang und A. C. Bishop, *Engineered inhibitor sensitivity in the WPD loop of a protein tyrosine phosphatase*. Biochemistry, 2008. **47** (15): 4491-500.
164. O. Erster et al., *Ligand interaction scan: a general method for engineering ligand-sensitive protein alleles*. Nat Methods, 2007. **4** (5): 393-5.
165. X. Y. Zhang und A. C. Bishop, *Site-specific incorporation of allosteric-inhibition sites in a protein tyrosine phosphatase*. J Am Chem Soc, 2007. **129** (13): 3812-3.
166. G. Guntas et al., *A molecular switch created by in vitro recombination of nonhomologous genes*. Chem Biol, 2004. **11** (11): 1483-7.
167. P. J. Belshaw et al., *Rational Design of Orthogonal Receptor-Ligand Combinations*. Angew Chem Int Ed Engl, 1995. **34** (19): 2129-32.
168. K. Shah et al., *Engineering unnatural nucleotide specificity for Rous sarcoma virus tyrosine kinase to uniquely label its direct substrates*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1997. **94** (8): 3565-70.
169. Y. Liu et al., *Engineering Src family protein kinases with unnatural nucleotide specificity*. Chem Biol, 1998. **5** (2): 91-101.
170. A. C. Bishop et al., *A chemical switch for inhibitor-sensitive alleles of any protein kinase*. Nature, 2000. **407** (6802): 395-401.
171. H. Habelhah et al., *Identification of new JNK substrate using ATP pocket mutant JNK and a corresponding ATP analogue*. J Biol Chem, 2001. **276** (21): 18090-5.
172. S. N. Boyle und A. J. Koleske, *Use of a chemical genetic technique to identify myosin IIb as a substrate of the Abl-related gene (Arg) tyrosine kinase*. Biochemistry, 2007. **46** (41): 11614-20.
173. J. T. Koh, *Engineering selectivity and discrimination into ligand-receptor interfaces*. Chem Biol, 2002. **9** (1): 17-23.
174. S. M. Ulrich et al., *Towards the engineering of an orthogonal protein kinase/nucleotide triphosphate pair*. Tetrahedron, 2000. **56**: 9495-502.
175. N. Tairis et al., *Alteration in the retinoid specificity of retinoic acid receptor-beta by site-directed mutagenesis of Arg269 and Lys220*. J Biol Chem, 1995. **270** (31): 18380-7.
176. J. T. Koh et al., *Selective regulation of gene expression using rationally-modified retinoic acid receptors*. J Am Chem Soc, 1999. **121** (9): 1984-5.
177. C. N. Cronin et al., *Reversal of substrate charge specificity by site-directed mutagenesis of aspartate aminotransferase*. J Am Chem Soc, 1987. **109** (7): 2222-3.
178. Z. Guo et al., *Designing small-molecule switches for protein-protein interactions*. Science, 2000. **288** (5473): 2042-5.
179. A. E. Eriksson et al., *Response of a protein structure to cavity-creating mutations and its relation to the hydrophobic effect*. Science, 1992. **255** (5041): 178-83.
180. A. E. Eriksson et al., *A cavity-containing mutant of T4 lysozyme is stabilized by buried benzene*. Nature, 1992. **355** (6358): 371-3.

181. A. Morton et al., *Energetic origins of specificity of ligand binding in an interior nonpolar cavity of T4 lysozyme*. Biochemistry, 1995. **34** (27): 8564-75.
182. A. Morton und B. W. Matthews, *Specificity of ligand binding in a buried nonpolar cavity of T4 lysozyme: linkage of dynamics and structural plasticity*. Biochemistry, 1995. **34** (27): 8576-88.
183. B. Q. Wei et al., *A model binding site for testing scoring functions in molecular docking*. J Mol Biol, 2002. **322** (2): 339-55.
184. L. Liu et al., *Halogenated Benzenes Bound within a Non-polar Cavity in T4 Lysozyme Provide Examples of I...S and I...Se Halogen-bonding*. J Mol Biol, 2008. **in press**.
185. M. S. Yousef et al., *Use of sequence duplication to engineer a ligand-triggered, long-distance molecular switch in T4 lysozyme*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101** (32): 11583-6.
186. M. Sagermann et al., *Structural characterization of an engineered tandem repeat contrasts the importance of context and sequence in protein folding*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96** (11): 6078-83.
187. M. Sagermann et al., *Long-distance conformational changes in a protein engineered by modulated sequence duplication*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100** (16): 9191-5.
188. A. J. Koleske et al., *Essential roles for the Abl and Arg tyrosine kinases in neurulation*. Neuron, 1998. **21** (6): 1259-72.
189. E. E. Grevenko et al., *Abelson kinase regulates epithelial morphogenesis in Drosophila*. J Cell Biol, 2001. **155** (7): 1185-98.
190. K. H. Kain und R. L. Klemke, *Inhibition of cell migration by Abl family tyrosine kinases through uncoupling of Crk-CAS complexes*. J Biol Chem, 2001. **276** (19): 16185-92.
191. R. Plattner et al., *A new link between the c-Abl tyrosine kinase and phosphoinositide signalling through PLC-gamma1*. Nat Cell Biol, 2003. **5** (4): 309-19.
192. F. Frasca et al., *Tyrosine kinase inhibitor STI571 enhances thyroid cancer cell motile response to Hepatocyte Growth Factor*. Oncogene, 2001. **20** (29): 3845-56.
193. R. Plattner et al., *c-Abl is activated by growth factors and Src family kinases and has a role in the cellular response to PDGF*. Genes Dev, 1999. **13** (18): 2400-11.
194. S. N. Boyle et al., *A critical role for cortactin phosphorylation by Abl-family kinases in PDGF-induced dorsal-wave formation*. Curr Biol, 2007. **17** (5): 445-51.
195. Z. Wills et al., *Profilin and the Abl tyrosine kinase are required for motor axon outgrowth in the Drosophila embryo*. Neuron, 1999. **22** (2): 291-9.
196. E. M. Moresco et al., *Integrin-mediated dendrite branch maintenance requires Abelson (Abl) family kinases*. J Neurosci, 2005. **25** (26): 6105-18.
197. J. Groffen et al., *Homology between phosphotyrosine acceptor site of human c-abl and viral oncogene products*. Nature, 1983. **304** (5922): 167-9.
198. D. Stehelin et al., *DNA related to the transforming gene(s) of avian sarcoma viruses is present in normal avian DNA*. Nature, 1976. **260** (5547): 170-3.
199. G. Superti-Furga und S. A. Courtneidge, *Structure-function relationships in Src family and related protein tyrosine kinases*. Bioessays, 1995. **17** (4): 321-30.
200. R. A. Van Etten, *Cycling, stressed-out and nervous: cellular functions of c-Abl*. Trends Cell Biol, 1999. **9** (5): 179-86.
201. M. W. Renshaw et al., *Differential expression of type-specific c-abl mRNAs in mouse tissues and cell lines*. Mol Cell Biol, 1988. **8** (10): 4547-51.
202. J. M. Smith und B. J. Mayer, *Abl: mechanisms of regulation and activation*. Front Biosci, 2002. **7**: d31-42.
203. P. Jackson und D. Baltimore, *N-terminal mutations activate the leukemogenic potential of the myristoylated form of c-abl*. Embo J, 1989. **8** (2): 449-56.
204. O. Hantschel et al., *A myristoyl/phosphotyrosine switch regulates c-Abl*. Cell, 2003. **112** (6): 845-57.
205. Y. Q. Gosser et al., *The solution structure of Abl SH3, and its relationship to SH2 in the SH(32) construct*. Structure, 1995. **3** (10): 1075-86.
206. M. Overduin et al., *Three-dimensional solution structure of the src homology 2 domain of c-abl*. Cell, 1992. **70** (4): 697-704.
207. T. Schindler et al., *Structural mechanism for STI-571 inhibition of abelson tyrosine kinase*. Science, 2000. **289** (5486): 1938-42.
208. B. Nagar et al., *Crystal structures of the kinase domain of c-Abl in complex with the small molecule inhibitors PD173955 and imatinib (STI-571)*. Cancer Res, 2002. **62** (15): 4236-43.
209. B. Nagar et al., *Structural basis for the autoinhibition of c-Abl tyrosine kinase*. Cell, 2003. **112** (6): 859-71.
210. A. M. Pendergast, *The Abl family kinases: mechanisms of regulation and signaling*. Adv Cancer Res, 2002. **85**: 51-100.
211. H. Pluk et al., *Autoinhibition of c-Abl*. Cell, 2002. **108** (2): 247-59.

212. B. Nagar et al., *Organization of the SH3-SH2 unit in active and inactive forms of the c-Abl tyrosine kinase*. Mol Cell, 2006. **21** (6): 787-98.
213. S. Chen et al., *Tyrosine phosphorylation in the SH3 domain disrupts negative regulatory interactions within the c-Abl kinase core*. J Mol Biol, 2008. **383** (2): 414-23.
214. S. Chen et al., *Unfolding in the SH3 Domain of the Abelson Tyrosine Kinase is Inhibited by Intramolecular Binding*. FASEB J, 2006. **20** (5): A1351.
215. R. Ren et al., *Identification of a ten-amino acid proline-rich SH3 binding site*. Science, 1993. **259** (5098): 1157-61.
216. R. J. Rickles et al., *Identification of Src, Fyn, Lyn, PI3K and Abl SH3 domain ligands using phage display libraries*. Embo J, 1994. **13** (23): 5598-604.
217. W. A. Lim et al., *Structural determinants of peptide-binding orientation and of sequence specificity in SH3 domains*. Nature, 1994. **372** (6504): 375-9.
218. A. Musacchio et al., *High-resolution crystal structures of tyrosine kinase SH3 domains complexed with proline-rich peptides*. Nat Struct Biol, 1994. **1** (8): 546-51.
219. M. T. Pisabarro et al., *Homology modeling of the Abl-SH3 domain*. Proteins, 1994. **20** (3): 203-15.
220. M. T. Pisabarro und L. Serrano, *Rational design of specific high-affinity peptide ligands for the Abl-SH3 domain*. Biochemistry, 1996. **35** (33): 10634-40.
221. M. T. Pisabarro et al., *Crystal structure of the abl-SH3 domain complexed with a designed high-affinity peptide ligand: implications for SH3-ligand interactions*. J Mol Biol, 1998. **281** (3): 513-21.
222. Z. Weng et al., *Structure-function analysis of SH3 domains: SH3 binding specificity altered by single amino acid substitutions*. Mol Cell Biol, 1995. **15** (10): 5627-34.
223. A. B. Sparks et al., *Distinct ligand preferences of Src homology 3 domains from Src, Yes, Abl, Cortactin, p53bp2, PLCgamma, Crk, and Grb2*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. **93** (4): 1540-4.
224. S. Feng et al., *Two binding orientations for peptides to the Src SH3 domain: development of a general model for SH3-ligand interactions*. Science, 1994. **266** (5188): 1241-7.
225. DeLano Scientific LLC. <http://pymol.org/>
226. M. T. Pisabarro et al., *Molecular modeling of the interaction of polyproline-based peptides with the Abl-SH3 domain: rational modification of the interaction*. Protein Eng, 1994. **7** (12): 1455-62.
227. A. Musacchio et al., *SH3--an abundant protein domain in search of a function*. FEBS Lett, 1992. **307** (1): 55-61.
228. S. Panni et al., *In vitro evolution of recognition specificity mediated by SH3 domains reveals target recognition rules*. J Biol Chem, 2002. **277** (24): 21666-74.
229. V. G. Eijssink et al., *Directed evolution of enzyme stability*. Biomol Eng, 2005. **22** (1-3): 21-30.
230. S. M. Larson und A. R. Davidson, *The identification of conserved interactions within the SH3 domain by alignment of sequences and structures*. Protein Sci, 2000. **9** (11): 2170-80.
231. S. Ventura et al., *Conformational strain in the hydrophobic core and its implications for protein folding and design*. Nat Struct Biol, 2002. **9** (6): 485-93.
232. A. A. Di Nardo et al., *The relationship between conservation, thermodynamic stability, and function in the SH3 domain hydrophobic core*. J Mol Biol, 2003. **333** (3): 641-55.
233. A. M. Buckle et al., *Crystal structural analysis of mutations in the hydrophobic cores of barnase*. J Mol Biol, 1993. **234** (3): 847-60.
234. S. E. Jackson et al., *Effect of cavity-creating mutations in the hydrophobic core of chymotrypsin inhibitor 2*. Biochemistry, 1993. **32** (42): 11259-69.
235. K. L. Schweiker et al., *Computational design of the Fyn SH3 domain with increased stability through optimization of surface charge charge interactions*. Protein Sci, 2007. **16** (12): 2694-702.
236. J. Kuriyan und D. Cowburn, *Modular peptide recognition domains in eukaryotic signaling*. Annu Rev Biophys Biomol Struct, 1997. **26**: 259-88.
237. J. Sambrook und D. W. Russel, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2001. 3. Edition; Cold Spring Harbour Laboratory Press (New York).
238. H. C. Birnboim und J. Doly, *A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA*. Nucleic Acids Res, 1979. **7** (6): 1513-23.
239. K. B. Mullis und F. A. Faloona, *Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction*. Methods Enzymol, 1987. **155**: 335-50.
240. R. Xu et al., *Chemical ligation of folded recombinant proteins: segmental isotopic labeling of domains for NMR studies*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96** (2): 388-93.
241. C. Prodromou und L. H. Pearl, *Recursive PCR: a novel technique for total gene synthesis*. Protein Eng, 1992. **5** (8): 827-9.
242. Clontech (Mountain View), *Yeast Protocols Handbook (Handbuch)*, 2001.
243. H. Ito et al., *Transformation of intact yeast cells treated with alkali cations*. J Bacteriol, 1983. **153** (1): 163-8.

244. R. H. Schiestl und R. D. Gietz, *High efficiency transformation of intact yeast cells using single stranded nucleic acids as a carrier*. Curr Genet, 1989. **16** (5-6): 339-46.
245. D. Gietz et al., *Improved method for high efficiency transformation of intact yeast cells*. Nucleic Acids Res, 1992. **20** (6): 1425.
246. L. Breeden und K. Nasmyth, *Regulation of the yeast HO gene*. Cold Spring Harb Symp Quant Biol, 1985. **50**: 643-50.
247. S. Schneider et al., *An in vitro assay of beta-galactosidase from yeast*. Biotechniques, 1996. **20** (6): 960-2.
248. J. H. Miller, *Experiments in Molecular Genetics*. 1972. Cold Spring Harbor Laboratory (Cold Spring Harbor, NY).
249. U. K. Laemmli, *Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4*. Nature, 1970. **227** (5259): 680-5.
250. J. Bennett und K. J. Scott, *Quantitative staining of fraction I protein in polyacrylamide gels using Coomassie brilliant blue*. Anal Biochem, 1971. **43** (1): 173-82.
251. H. Towbin et al., *Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1979. **76** (9): 4350-4.
252. S. C. Gill und P. H. von Hippel, *Calculation of protein extinction coefficients from amino acid sequence data*. Anal Biochem, 1989. **182** (2): 319-26.
253. D. Garbe, *In vitro-Zyklisierung von Peptidyl-Thioester-Analoga mit (E)-Alken-Dipeptidisoestern durch die nichtribosomalen Thioesterase-Domänen der Antibiotika Surfactin A und Tyrocidin A*. 2003. Diplomarbeit. Philipps-Universität, Marburg.
254. R. B. Merrifield, *Automated synthesis of peptides*. Science, 1965. **150** (693): 178-85.
255. R. B. Merrifield, *Solid-Phase Peptide Syntheses*. Endeavour, 1965. **24**: 3-7.
256. L. A. Carpino und G. Y. Han, *9-Fluorenylmethoxycarbonyl function, a new base-sensitive amino-protecting group*. J Am Chem Soc, 1970. **19** (92): 5748-9.
257. O. Warburg und W. Christian, *Isolierung und Kristallisation des Gärungsferments Enolase*. Biochem Z, 1941. **310**: 384-421.
258. A. J. Adler et al., *Circular dichroism and optical rotatory dispersion of proteins and polypeptides*. Methods Enzymol, 1973. **27**: 675-735.
259. R. Winter und F. Noll, *Methoden der biophysikalischen Chemie*. 1998. (C. Elschenbroich, F. Hensel und H. Hopf, Ed(n)). Teubner Verlag (Stuttgart).
260. N. Greenfield und G. D. Fasman, *Computed circular dichroism spectra for the evaluation of protein conformation*. Biochemistry, 1969. **8** (10): 4108-16.
261. A. R. Viguera et al., *Characterization of the interaction of natural proline-rich peptides with five different SH3 domains*. Biochemistry, 1994. **33** (36): 10925-33.
262. J. Liu et al., *Structural insight into the binding diversity between the human Nck2 SH3 domains and proline-rich proteins*. Biochemistry, 2006. **45** (23): 7171-84.
263. A. Andreadis et al., *Nucleotide sequence of yeast LEU2 shows 5'-noncoding region has sequences cognate to leucine*. Cell, 1982. **31** (2 Pt 1): 319-25.
264. D. C. Dalgarno et al., *SH3 Domains and Drug Design: Ligands, Structure and Biological Function*. Biopoly, 1997. **43**: 383-400.
265. F. Santamaria et al., *Reexamination of the recognition preference of the specificity pocket of the Abl SH3 domain*. J Mol Recognit, 2003. **16** (3): 131-8.
266. S. Knapp et al., *Thermal unfolding of small proteins with SH3 domain folding pattern*. Proteins, 1998. **31** (3): 309-19.
267. K. D. Powell und M. C. Fitzgerald, *Accuracy and precision of a new H/D exchange- and mass spectrometry-based technique for measuring the thermodynamic properties of protein-peptide complexes*. Biochemistry, 2003. **42** (17): 4962-70.
268. K. Alexandropoulos et al., *Proline-rich sequences that bind to Src homology 3 domains with individual specificities*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1995. **92** (8): 3110-4.
269. M. E. Noble et al., *Crystal structure of the SH3 domain in human Fyn; comparison of the three-dimensional structures of SH3 domains in tyrosine kinases and spectrin*. Embo J, 1993. **12** (7): 2617-24.
270. A. Sacan et al., *Integrated search and alignment of protein structures*. Bioinformatics, 2008. **24** (24): 2872-9.
271. N. Q. Meinander und B. Hahn-Hagerdal, *Fed-batch xylitol production with two recombinant Saccharomyces cerevisiae strains expressing XYL1 at different levels, using glucose as a cosubstrate: A comparison of production parameters and strain stability*. Biotechnol Bioeng, 1997. **54** (4): 391-9.
272. V. Ratushny und E. Golemis, *Resolving the network of cell signaling pathways using the evolving yeast two-hybrid system*. Biotechniques, 2008. **44** (5): 655-62.
273. Clontech (Mountain View), *Clontechiques 7*. 1996.
274. Clontech (Mountain View), *Clontechiques 1*. 2009.

275. J. L. Hilton et al., *Mode of action of the herbicide, 3-amino-1,2,4-triazole(amtrole): inhibition of an enzyme of histidine biosynthesis*. Arch Biochem Biophys, 1965. **112** (3): 544-7.
276. T. Klopotoski und A. Wiater, *Synergism of aminotriazole and phosphate on the inhibition of yeast imidazole glycerol phosphate dehydratase*. Arch Biochem Biophys, 1965. **112** (3): 562-6.
277. A. Wiater et al., *Structural requirements for inhibition of yeast imidazoleglycerol phosphate dehydratase by triazole and anion inhibitors*. Acta Biochim Pol, 1971. **18** (3): 289-97.
278. P. M. Kane et al., *Protein splicing converts the yeast TFP1 gene product to the 69-kD subunit of the vacuolar H(+)-adenosine triphosphatase*. Science, 1990. **250** (4981): 651-7.
279. J. P. Gogarten et al., *Inteins: structure, function, and evolution*. Annu Rev Microbiol, 2002. **56**: 263-87.
280. F. B. Perler, *InBase: the Intein Database*. Nucleic Acids Res, 2002. **30** (1): 383-4.
281. S. Pietrovski, *Conserved sequence features of inteins (protein introns) and their use in identifying new inteins and related proteins*. Protein Sci, 1994. **3** (12): 2340-50.
282. F. B. Perler et al., *Compilation and analysis of intein sequences*. Nucleic Acids Res, 1997. **25** (6): 1087-93.
283. S. Pietrovski, *Modular organization of inteins and C-terminal autocatalytic domains*. Protein Sci, 1998. **7** (1): 64-71.
284. C. J. Noren et al., *Protein-Spleißen: Mechanismus und Anwendungen*. Angew Chem, 2000. **112** (3): 458-76.
285. J. Yang et al., *Intein harbouring large tandem repeats in replicative DNA helicase of Trichodesmium erythraeum*. Mol Microbiol, 2004. **51** (4): 1185-92.
286. P. L. Starokadomskyy, *Protein Splicing*. Mol Biol, 2007. **41** (2): 278-93.
287. A. A. Cooper und T. H. Stevens, *Protein splicing: self-splicing of genetically mobile elements at the protein level*. Trends Biochem Sci, 1995. **20** (9): 351-6.
288. X. Q. Liu, *Protein-splicing intein: Genetic mobility, origin, and evolution*. Annu Rev Genet, 2000. **34**: 61-76.
289. H. Wu et al., *Protein trans-splicing by a split intein encoded in a split DnaE gene of Synechocystis sp. PCC6803*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95** (16): 9226-31.
290. T. C. Evans, Jr. et al., *Protein trans-splicing and cyclization by a naturally split intein from the dnaE gene of Synechocystis species PCC6803*. J Biol Chem, 2000. **275** (13): 9091-4.
291. H. Iwai et al., *Highly efficient protein trans-splicing by a naturally split DnaE intein from Nostoc punctiforme*. FEBS Lett, 2006. **580** (7): 1853-8.
292. X. Y. Wei et al., *Expression of split dnaE genes and trans-splicing of DnaE intein in the developmental cyanobacterium Anabaena sp. PCC 7120*. Res Microbiol, 2006. **157** (3): 227-34.
293. J. J. Choi et al., *Protein trans-splicing and characterization of a split family B-type DNA polymerase from the hyperthermophilic archaeal parasite Nanoarchaeum equitans*. J Mol Biol, 2006. **356** (5): 1093-106.
294. M. Q. Xu et al., *In vitro protein splicing of purified precursor and the identification of a branched intermediate*. Cell, 1993. **75** (7): 1371-7.
295. M. Q. Xu et al., *Protein splicing: an analysis of the branched intermediate and its resolution by succinimide formation*. Embo J, 1994. **13** (23): 5517-22.
296. Y. Shao et al., *Protein splicing: evidence for an N-O acyl rearrangement as the initial step in the splicing process*. Biochemistry, 1996. **35** (12): 3810-5.
297. Y. Shao und H. Paulus, *Protein splicing: estimation of the rate of O-N and S-N acyl rearrangements, the last step of the splicing process*. J Pept Res, 1997. **50** (3): 193-8.
298. X. Duan et al., *Crystal structure of PI-SceI, a homing endonuclease with protein splicing activity*. Cell, 1997. **89** (4): 555-64.
299. T. Klabunde et al., *Crystal structure of GyrA intein from Mycobacterium xenopi reveals structural basis of protein splicing*. Nat Struct Biol, 1998. **5** (1): 31-6.
300. T. M. Hall et al., *Crystal structure of a Hedgehog autoprocessing domain: homology between Hedgehog and self-splicing proteins*. Cell, 1997. **91** (1): 85-97.
301. E. Werner et al., *High resolution crystal structure of domain I of the Saccharomyces cerevisiae homing endonuclease PI-SceI*. Nucleic Acids Res, 2002. **30** (18): 3962-71.
302. K. Shingledecker et al., *Molecular dissection of the Mycobacterium tuberculosis RecA intein: design of a minimal intein and of a trans-splicing system involving two intein fragments*. Gene, 1998. **207** (2): 187-95.
303. K. V. Mills et al., *Protein splicing in trans by purified N- and C-terminal fragments of the Mycobacterium tuberculosis RecA intein*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95** (7): 3543-8.
304. M. W. Southworth et al., *Control of protein splicing by intein fragment reassembly*. Embo J, 1998. **17** (4): 918-26.
305. H. Wu et al., *Protein trans-splicing and functional mini-inteins of a cyanobacterial dnaB intein*. Biochim Biophys Acta, 1998. **1387** (1-2): 422-32.

306. S. Brenzel et al., *Engineering artificially split inteins for applications in protein chemistry: biochemical characterization of the split Ssp DnaB intein and comparison to the split Sce VMA intein*. Biochemistry, 2006. **45** (6): 1571-8.
307. C. Ludwig et al., *Ligation eines synthetischen Peptids an den N-Terminus eines rekombinanten Proteins durch semisynthetisches trans-Proteinspleißen*. Angew Chem, 2006. **118** (31): 5343-7.
308. T. Kurpiers und H. D. Mootz, *Site-specific chemical modification of proteins with a prelabelled cysteine tag using the artificially split Mxe GyrA intein*. Chembiochem, 2008. **9** (14): 2317-25.
309. S. Brenzel und H. D. Mootz, *Design of an intein that can be inhibited with a small molecule ligand*. J Am Chem Soc, 2005. **127** (12): 4176-7.
310. A. B. Tyszkiewicz und T. W. Muir, *Activation of protein splicing with light in yeast*. Nat Methods, 2008. **5** (4): 303-5.
311. Y. Ding et al., *Crystal structure of a mini-intein reveals a conserved catalytic module involved in side chain cyclization of asparagine during protein splicing*. J Biol Chem, 2003. **278** (40): 39133-42.
312. W. Sun et al., *Synthetic two-piece and three-piece split inteins for protein trans-splicing*. J Biol Chem, 2004. **279** (34): 35281-6.
313. R. Mizutani et al., *Protein-splicing reaction via a thiazolidine intermediate: crystal structure of the VMA1-derived endonuclease bearing the N and C-terminal propeptides*. J Mol Biol, 2002. **316** (4): 919-29.
314. B. W. Poland et al., *Structural insights into the protein splicing mechanism of PI-SceI*. J Biol Chem, 2000. **275** (22): 16408-13.
315. A. Romanelli et al., *Semisynthesis of a segmental isotopically labeled protein splicing precursor: NMR evidence for an unusual peptide bond at the N-extein-intein junction*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101** (17): 6397-402.
316. J. Zettler et al., *The naturally split Npu DnaE intein exhibits an extraordinarily high rate in the protein trans-splicing reaction*. FEBS Lett, 2009. **583** (5): 909-14.
317. C. Ludwig, *Protein-Semisynthese und mechanistische Studien zum Proteinspleißen mit Hilfe eines gespaltenen Inteins*. 2008. Doktorarbeit. Technische Universität Dortmund, Dortmund.
318. B. Bartolome et al., *Construction and properties of a family of pACYC184-derived cloning vectors compatible with pBR322 and its derivatives*. Gene, 1991. **102** (1): 75-8.
319. H. R. Hoogenboom et al., *Multi-subunit proteins on the surface of filamentous phage: methodologies for displaying antibody (Fab) heavy and light chains*. Nucleic Acids Res, 1991. **19** (15): 4133-7.
320. A. D. Keefe et al., *One-step purification of recombinant proteins using a nanomolar-affinity streptavidin-binding peptide, the SBP-Tag*. Protein Expr Purif, 2001. **23** (3): 440-6.
321. G. P. Dotto und N. D. Zinder, *Reduction of the minimal sequence for initiation of DNA synthesis by qualitative or quantitative changes of an initiator protein*. Nature, 1984. **311** (5983): 279-80.
322. F. van den Ent und J. Lowe, *RF cloning: a restriction-free method for inserting target genes into plasmids*. J Biochem Biophys Methods, 2006. **67** (1): 67-74.
323. M. E. Kovach et al., *pBBR1MCS: a broad-host-range cloning vector*. Biotechniques, 1994. **16** (5): 800-2.
324. T. Kurpiers und H. D. Mootz, *Regioselektive Cysteinbiokonjugation durch Anhängen eines modifizierten Cystein-tags an ein Protein mithilfe von trans-Proteinspleißen*. Angew Chem, 2007. **119** (27): 5327-30.
325. S. Voss und A. Skerra, *Mutagenesis of a flexible loop in streptavidin leads to higher affinity for the Strep-tag II peptide and improved performance in recombinant protein purification*. Protein Eng, 1997. **10** (8): 975-82.
326. D. R. Gretch et al., *The use of biotinylated monoclonal antibodies and streptavidin affinity chromatography to isolate herpesvirus hydrophobic proteins or glycoproteins*. Anal Biochem, 1987. **163** (1): 270-7.
327. K. R. Yamamoto et al., *Rapid bacteriophage sedimentation in the presence of polyethylene glycol and its application to large-scale virus purification*. Virology, 1970. **40** (3): 734-44.
328. Invitrogen (Karlsruhe), *Protokoll zum M13K07 Helferphagen*. 2005.
329. H. B. Lowman, 1998. S. 249. Aus: *Methods in molecular biology* Vol. 87. (S. Cabilly, Ed(n)). Humana Press (Totowa).
330. J. Koch et al., *Rapid titration of multiple samples of filamentous bacteriophage (M13) on nitrocellulose filters*. Biotechniques, 2000. **29** (6): 1196-8, 2002.
331. J. Rosenfeld et al., *In-gel digestion of proteins for internal sequence analysis after one- or two-dimensional gel electrophoresis*. Anal Biochem, 1992. **203** (1): 173-9.
332. V. Kostka und F. H. Carpenter, *Inhibition of Chymotrypsin Activity in Crystalline Trypsin Preparations*. J Biol Chem, 1964. **239**: 1799-803.
333. ExPASy Proteomics tools. <http://expasy.org/tools/peptide-mass.html>

334. R. N. Konings et al., *Identification and characterization of the in vitro synthesized gene products of bacteriophage M13*. J Virol, 1975. **15** (3): 570-84.
335. S. Busse et al., *Sensitivity studies for specific binding reactions using the biotin/streptavidin system by evanescent optical methods*. Biosens Bioelectron, 2002. **17** (8): 704-10.
336. M. S. Dennis und H. B. Lowman, *Phage selection strategies for improved affinity and specificity of proteins and peptides*. 2004. Aus: *Phage Display - A Practical Approach* (T. Clackson und H. B. Lowman, Ed(n)). Oxford University Press (Oxford, New York).
337. W. van Dongen et al., *Evidence for an unusual mechanism of membrane translocation of the periplasmic hydrogenase of Desulfovibrio vulgaris (Hildenborough), as derived from expression in Escherichia coli*. FEMS Microbiol Lett, 1988. **50**: 5-9.
338. M. Paschke und W. Hohne, *A twin-arginine translocation (Tat)-mediated phage display system*. Gene, 2005. **350** (1): 79-88.
339. J. Yin et al., *Phagemid encoded small molecules for high throughput screening of chemical libraries*. J Am Chem Soc, 2004. **126** (42): 13570-1.
340. Z. Zhou et al., *Genetically encoded short peptide tags for orthogonal protein labeling by Sfp and AcpS phosphopantetheinyl transferases*. ACS Chem Biol, 2007. **2** (5): 337-46.
341. L. Dente et al., *Modified phage peptide libraries as a tool to study specificity of phosphorylation and recognition of tyrosine containing peptides*. J Mol Biol, 1997. **269** (5): 694-703.
342. P. E. Dawson et al., *Synthesis of proteins by native chemical ligation*. Science, 1994. **266** (5186): 776-9.
343. M. A. Dwyer et al., *Biosynthetic phage display: a novel protein engineering tool combining chemical and genetic diversity*. Chem Biol, 2000. **7** (4): 263-74.
344. L. Wang und P. G. Schultz, *Die Erweiterung des genetischen Codes*. Angew Chem, 2004. **117** (1): 34-68.
345. F. Tian et al., *A phage display system with unnatural amino acids*. J Am Chem Soc, 2004. **126** (49): 15962-3.
346. H. C. Kolb et al., *Click-Chemie: Diverse chemische Funktionalität mit einer Handvoll guter Reaktionen*. Angew Chem, 2001. **113** (11): 2056-75.
347. A. J. Link und D. A. Tirrell, *Cell surface labeling of Escherichia coli via copper(I)-catalyzed [3+2] cycloaddition*. J Am Chem Soc, 2003. **125** (37): 11164-5.
348. S. W. Michnick, *Exploring protein interactions by interaction-induced folding of proteins from complementary peptide fragments*. Curr Opin Struct Biol, 2001. **11** (4): 472-7.
349. J. Shi und T. W. Muir, *Development of a tandem protein trans-splicing system based on native and engineered split inteins*. J Am Chem Soc, 2005. **127** (17): 6198-206.
350. K. P. Kent et al., *Deconstructing green fluorescent protein*. J Am Chem Soc, 2008. **130** (30): 9664-5.
351. A. Ullmann et al., *Characterization by in vitro complementation of a peptide corresponding to an operator-proximal segment of the beta-galactosidase structural gene of Escherichia coli*. J Mol Biol, 1967. **24** (2): 339-43.
352. R. T. Raines, *Ribonuclease A*. Chem Rev, 1998. **98** (3): 1045-66.
353. A. D. Kippen et al., *Folding of barnase in parts*. Biochemistry, 1994. **33** (12): 3778-86.
354. S. H. Park und R. T. Raines, *Fluorescence polarization assay to quantify protein-protein interactions*. Methods Mol Biol, 2004. **261**: 161-6.
355. T. Ando et al., *Construction of a small-molecule-integrated semisynthetic split intein for in vivo protein ligation*. Chem Commun (Camb), 2007. 4995-7.
356. J. A. Lamboy et al., *Chemical and genetic wrappers for improved phage and RNA display*. Chembiochem, 2008. **9** (17): 2846-52.
357. G. A. Weiss et al., *Mutational analysis of the major coat protein of M13 identifies residues that control protein display*. Protein Sci, 2000. **9** (4): 647-54.
358. S. Rondot et al., *A helper phage to improve single-chain antibody presentation in phage display*. Nat Biotechnol, 2001. **19** (1): 75-8.
359. H. Baek et al., *An improved helper phage system for efficient isolation of specific antibody molecules in phage display*. Nucleic Acids Res, 2002. **30** (5): e18.
360. G. Soltes et al., *A new helper phage and phagemid vector system improves viral display of antibody Fab fragments and avoids propagation of insert-less virions*. J Immunol Methods, 2003. **274** (1-2): 233-44.
361. G. Soltes et al., *Corrigendum: A new helper phage and phagemid vector system improves viral display of antibody Fab fragments and avoids propagation of insert-less virions*. J Immunol Methods, 2006. **311** (1-2): 226.
362. G. Soltes et al., *On the influence of vector design on antibody phage display*. J Biotechnol, 2007. **127** (4): 626-37.
363. C. Krebber et al., *Co-selection of cognate antibody-antigen pairs by selectively-infective phages*. FEBS Lett, 1995. **377** (2): 227-31.

- 364. J. A. Wells und H. B. Lowman, *Rapid evolution of peptide and protein binding properties in vitro*. Curr Opin Biotechnol, 1992. **3** (4): 355-62.
- 365. S. Mathys et al., *Characterization of a self-splicing mini-intein and its conversion into autocatalytic N- and C-terminal cleavage elements: facile production of protein building blocks for protein ligation*. Gene, 1999. **231** (1-2): 1-13.

13. Anhang

Tabelle 11. Übersicht der exprimierten Proteine.

Nr.	Beschreibung	Masse [Da]	Molarer Extinktionskoeffizient [M ⁻¹ cm ⁻¹]	Vektor	Plasmid-Name	Resistenz (Expressionsplasmid)
1	Abl SH3-His ₆	8540,3	15470	pET16b	pDG017	Amp ¹⁰⁰
4	Abl SH3 (A4V)-His ₆	8568,3	15470	pET16b	pDG023	Amp ¹⁰⁰
10	StrepII-gpD-DnaB ^C (107-154)-c myc	21790,2	27960	pET16b	pDG087	Amp ¹⁰⁰
11	MBP-DnaB ^N (1-104)-His ₆	56277,7	80330	pTrc99a	pTK56	Amp ¹⁰⁰
21	MBP-DnaB ^N (1-104, C1A)-His ₆	56245,6	80330	pTrc99a	pDG099	Amp ¹⁰⁰
24	SBP-MBP-DnaB ^N (1-104)-His ₆	61964,9	85830	pT7-SBP-2	pDG104	Amp ¹⁰⁰
25	StrepII-gpD-DnaB ^C (107-154)-His ₆	20388,5	27960	pET28a	pJZ35	Kan ⁵⁰
32	DnaB ^C (12-154)-Trx-His ₆	30213,4	33460	pSU38	pCL20	Kan ⁵⁰
40L	His ₆ -gpD-DnaB ^C (107-154)-+2 Bibliothek-c myc	21542,8 (Ile+2)	22460 (Ile+2)	pDG092	pDG105L	Cam ³⁴

Tabelle 12. Übersicht der verwendeten Hybride des Hefe-2-Hybridsystems.

Nr.	Beschreibung	Masse [Da]	Vektor	Plasmid-Name	Auxotrophie
6	LexA-Abl SH3	30336,5	pGILDA	pDG046	<i>HIS3</i>
7	LexA-Abl SH3 (A4F)	30412,6	pGILDA	pDG063	<i>HIS3</i>
7a	LexA-Abl SH3 (A4F, Bibliothek)	n. d.	pGILDA	pDG066	<i>HIS3</i>
8	B42 AD-HA Tag- APTYSPPPPPG GR (Abl SH3-Erkennungss.)-His ₆	14130,8	pB42AD	pDG043	<i>TRP1</i>

(n. d.: nicht definiert)

Tabelle 13. Übersicht der verwendeten Fusionsproteine mit Phagen-Hüllprotein pIII (vollständig) bzw. ΔpIII (verkürzt auf Aminosäuren 250-406).

Nr.	Beschreibung	Masse* [Da]	Vektor	Plasmid-Name	Resistenz (Phagemid-plasmid)
9	<i>PelB</i> SS-StrepII-gpD-DnaB ^C (107-154)-c myc-ΔpIII	38498,7	pDG025	pDG085	Amp ¹⁰⁰
16	<i>PelB</i> SS-His ₆ -gpD-DnaB ^C (107-154)-c myc-ΔpIII	38322,4	pDG085	pDG092	Cam ³⁴
22	<i>PelB</i> SS-c myc-pIII	45656,4	pDG092	pDG097	Cam ³⁴
23	<i>PelB</i> SS-nat. Abl SH3-c myc-ΔpIII	25976,7	pDG020	pDG025	Amp ¹⁰⁰
31	<i>PelB</i> SS-His ₆ -gpD-DnaB ^C (12-154, C50S)-c myc-ΔpIII	48516,3	pDG092	pDG095	Cam ³⁴

(* Masse ohne PelB-Signalsequenz)

Tabelle 14. Übersicht der verwendeten Oligonukleotide.

Name	Beschreibung	Länge	5'→3'-Sequenz
oDG001	5'-DNA-Sequenz, Einführung von Abl SH3-Erkennungssequenz in pDG001 (<i>Bam</i> HI)	42	<u>G AATTC</u> GCTCCAACCTTACTCTCC TCCACCTCCACCTGGTGGTA
oDG002	3'-DNA-Sequenz, Einführung von Abl SH3-Erkennungssequenz in pDG001 (<i>Bam</i> HI zerstört)	42	<u>G GATCT</u> ACCACCAGGTGGAGGT GGAGGAGAGTAAGTTGGAGCG
oDG004	3'-Primer, Einführung von c-Abl SH3-Domäne in pDG004 (<i>Kpn</i> I)	44	ATAGGATCC <u>GGTACCGG</u> TAGAG TTAAC GGGGGTGATGTAGTTGC
oDG007	5'-Primer, Einführung A4W-Mutation der c-Abl SH3 in pDG017	34	CAGGCCCTGTTTGTGT <u>TGGCTCTA</u> TGATTTTGTGG
oDG008	3'-Primer, Einführung A4W-Mutation der c-Abl SH3 in pDG017	34	CCACAAAATCATAGAGCCACAC AAACAGGGCCTG
oDG009	5'-Primer, Einführung A4V-Mutation der c-Abl SH3 in pDG017	34	CAGGCCCTGTTTGTG <u>GTGCTCTA</u> TGATTTTGTGG
oDG010	3'-Primer, Einführung A4V-Mutation der c-Abl SH3 in pDG017	34	CCACAAAATCATAGAGCACCAC AAACAGGGCCTG
oDG013	5'-DNA-Sequenz, Einführung von Linkersequenz in pDG003 (<i>Kpn</i> I)	20	<u>GGTAC CCTC</u> GAGGCTGGCGCAT CTG
oDG014	3'-DNA-Sequenz, Einführung von Linkersequenz in pDG003 (<i>Kpn</i> I)	28	<u>G GATCC</u> CAGATGCGCCAGCCTCG AGGGTAC
oDG015	5'-Primer, Zerstört <i>Sph</i> I in pDG016	37	GATTACGCCAAGCTTGCGTGCA AATTCTATTTC AAGG
oDG016	3'-Primer, Zerstört <i>Sph</i> I in pDG016	37	CCTTGAAATAGAATTTGCACGC AAGCTTGGCGTAATC
oDG021	5'-Primer, Einführung I19A-Mutation der c-Abl SH3 (A4W) in pDG028	33	GATAACACTCTCAGCGCCACTA AAGGTGAAAAG
oDG022	3'-Primer, Einführung I19A-Mutation der c-Abl SH3 (A4W) in pDG028	33	CTTTTCACCTTTAGTG <u>GCGCTGA</u> GAGTGTTATC
oDG023	5'-Primer, Einführung A4F-Mutation der c-Abl SH3 in pDG017	34	CAGGCCCTGTTTGTGT <u>TCCTCTA</u> TGATTTTGTGG
oDG024	3'-Primer, Einführung A4F-Mutation der c-Abl SH3 in pDG017	34	CCACAAAATCATAGAGGAACAC AAACAGGGCCTG
oDG032	5'-DNA-Sequenz, Einführung von StrepII-Tag in pHM135 (<i>Nco</i> I)	48	<u>C CATGG</u> CCCAGGCCTGGTCCCA CCCGCAGTTTGAAAAGGGCCTG CAGGG <u>C CATGG</u>
oDG033	3'-DNA-Sequenz, Einführung von StrepII-Tag in pHM135 (<i>Nco</i> I zerstört)	48	<u>C CATG</u> CCCTGCAGGCCCTTTTCA AACTGCGGGTGGGACCAGGCCT GGG <u>C CATGG</u>

Name	Beschreibung	Länge	5'→3'-Sequenz
oDG034	3'-Primer, Sequenzierprimer für pGILDA	22	CGTCAGCAGAGCTTCACCATTG
oDG035	5'-Primer, Einführung von <i>NcoI</i> in pGILDA	24	GATCCGTCGACCCATGGCGGCC GC
oDG036	3'-Primer, Einführung von <i>NcoI</i> in pGILDA	24	GCGGCCGCCATGGGTCGACGGA TC
oDG039	3'-Primer, Einführung von SH3-Erkennungssequenz-His ₆ in pB42AD (<i>XhoI</i>)	29	GCTACCCTCGAGACCGCGCTACT GCCGCC
oDG040	5'-Primer, Sequenzierprimer für pB42AD und pDG043	24	CCAGCCTCTTGCTGAGTGGAGAT G
oDG062	5'-Primer, Zerstört <i>NheI</i> in <i>HIS3</i> -Gen pDG047	37	CGTGGAGGGTAATTCTGGATGC CTCTGCAAAGCTTTC
oDG063	3'-Primer, Zerstört <i>NheI</i> in <i>HIS3</i> -Gen pDG047	37	GAAAGCTTTGCAGAGGCATCCA GAATTACCCTCCACG
oDG064	5'-Primer, Sequenzierprimer für pDG063	19	CATTGGGCGAGGTGGCTTC
oDG073	5'-Primer für rekursive PCR (<i>NheI</i>)	30	ctctatgattttGTGGCTAGCGGAGATA AC
oDG074	3'-Primer für rekursive PCR (<i>NheI</i>)	67	GATTATAACCCAAGACCCGsvnctt ttcacctttagtsvngctsvnagtGTTATCTCC GCTAGCCAC
oDG075	5'-Primer für rekursive PCR	42	CGGGTCTTGGGTTATAATCacaatg GGGAATGGGCTGAAGCC
oDG076	3'-Primer für rekursive PCR	41	CCATCCTTGGCCATTTTTTCgtttgG GCTTCAGCCCATTCCC
oDG077	5'-Primer für rekursive PCR	55	GAAAAATGGCCAAGGATGGnbsc caagcaactacnbsACCCCCGTAACTC TACC
oDG078	3'-Primer für rekursive PCR (<i>XhoI</i>)	36	ggtctactcgagggtaccGGTAGAGTTAA CGGGGGT
oDG085	5'-Primer, Einführung von His ₆ -Tag in pDG090 (<i>NcoI</i>)	52	ATCCATGGCTCAGCATCACCATC ACCATCACGCGAGCAAAGAAAC CTTTACC
oDG086	3'-Primer, Einführung von His ₆ -Tag in pDG090 (<i>NcoI</i>)	18	CTGGCCATGGCCGGCTGG
oDG089	5'-Primer, Einführung von Cam-Resistenzkassette in pDG092	54	caggtggcacttttcggggaaatgtgCGACGTT GATCGGCACGTAAGAGGTTC
oDG090	3'-Primer, Einführung von Cam-Resistenzkassette in pDG092	52	cctagatccttttaaattaaaaatgCTTATTAAT CAGATAAAATATTTCTAG

Name	Beschreibung	Länge	5'→3'-Sequenz
oDG091	5'-Primer, Einführung von DnaB ^C (12-154, C50S) in pDG095 (<i>Bam</i> HI)	34	T <u>AGGATCCTCTAGTAGCACAGG</u> AAAAAGAGTTTC
oDG092	3'-Primer, Einführung von DnaB ^C (12-154, C50S) in pDG095	19	GATCCTCTTCTGAGATGAG
oDG095	5'-Primer, Einführung C1A-Mutation in DnaB ^N (1-104) in pDG099 (<i>Eco</i> RV)	35	CAGAATTCTCCGGC GCGATATC TGGAGATAGTTTG
oDG096	3'-Primer, Einführung C1A-Mutation in DnaB ^N (1-104) in pDG099 (<i>Eco</i> RV)	35	CAAAC TATCTCCAGATATCGCG CCGGAGAATTCTG
oDG105	5'-Primer, Einführung von MBP-DnaB ^N (1-104)-His ₆ in pT7-SBP-2 (<i>Xho</i> I)	30	ATACTCGAGGAAATCGAAGAAG GTAAACTG
oDG106	3'-Primer, Einführung von MBP-DnaB ^N (1-104)-His ₆ in pT7-SBP-2 (<i>Kpn</i> I)	27	ATAGGTACCGTGATGGTGATGG TGATG
oDG107	3'-Primer, Einführung von +2-Bibliothek in pDG105L (<i>Not</i> I)	46	TAGCGGCCGCCTCGAGCTGCTC MNNACTGTTATGGACAATGATG TC
oDG108	5'-Primer, Sequenzierprimer für pDG105L	20	CGGAACGGCAATCAGCATCG
oHM108	5'-Primer, Einführung von c-Abl SH3-Domäne in pDG004 (<i>Nco</i> I)	41	ATACCATGGCCCAGGCCCTGTTT GTGGCACTCTATGATTTG
oHM110	3'-Primer, Verkürzung von <i>pIII</i> -Gen in pDG016 (inverse PCR über <i>Spe</i> I)	31	ATAACTAGTCCCATTCAGATCCT CTTCTGAG
oHM111	5'-Primer, Verkürzung von <i>pIII</i> -Gen in pDG016 (inverse PCR über <i>Spe</i> I)	32	ATATCTAGATAGGGTGGCGGCT CCGGTTCCGG
oJZ035	5'-Primer, Einführung von StreptII-gpD-DnaB ^C (107-154) in pJZ35 (<i>Nco</i> I)	60	ATACCATGGCCAGTTGGAGCCA CCGCAGTTCGAAAAAGCGAGC AAAGAAACCTTTACCC
oJZ036	3'-Primer, Einführung von StreptII-gpD-DnaB ^C (107-154) in pJZ35 (<i>Hind</i> III)	34	ATAAAGCTTACCGCAGGATCTA ATACTGTTATGG
oSB008	5'-Primer, Einführung von SH3-Erkennungssequenz-His ₆ in pB42AD	20	CGATGAAGCCCTGAAAGACG

(Restriktionsschnittstellen sind unterstrichen; im Rahmen der Klonierung zerstörte Schnittstellen sind gestrichelt unterstrichen; Punktmutationen sind fett hervorgehoben; degenerierte Basen sind in kursiv geschrieben; | bezeichnet das Ende oder den Anfang eines Oligonukleotids, das als Teil eines doppelstrangigen DNA-Abschnittes in ein Plasmid eingeführt wurde)

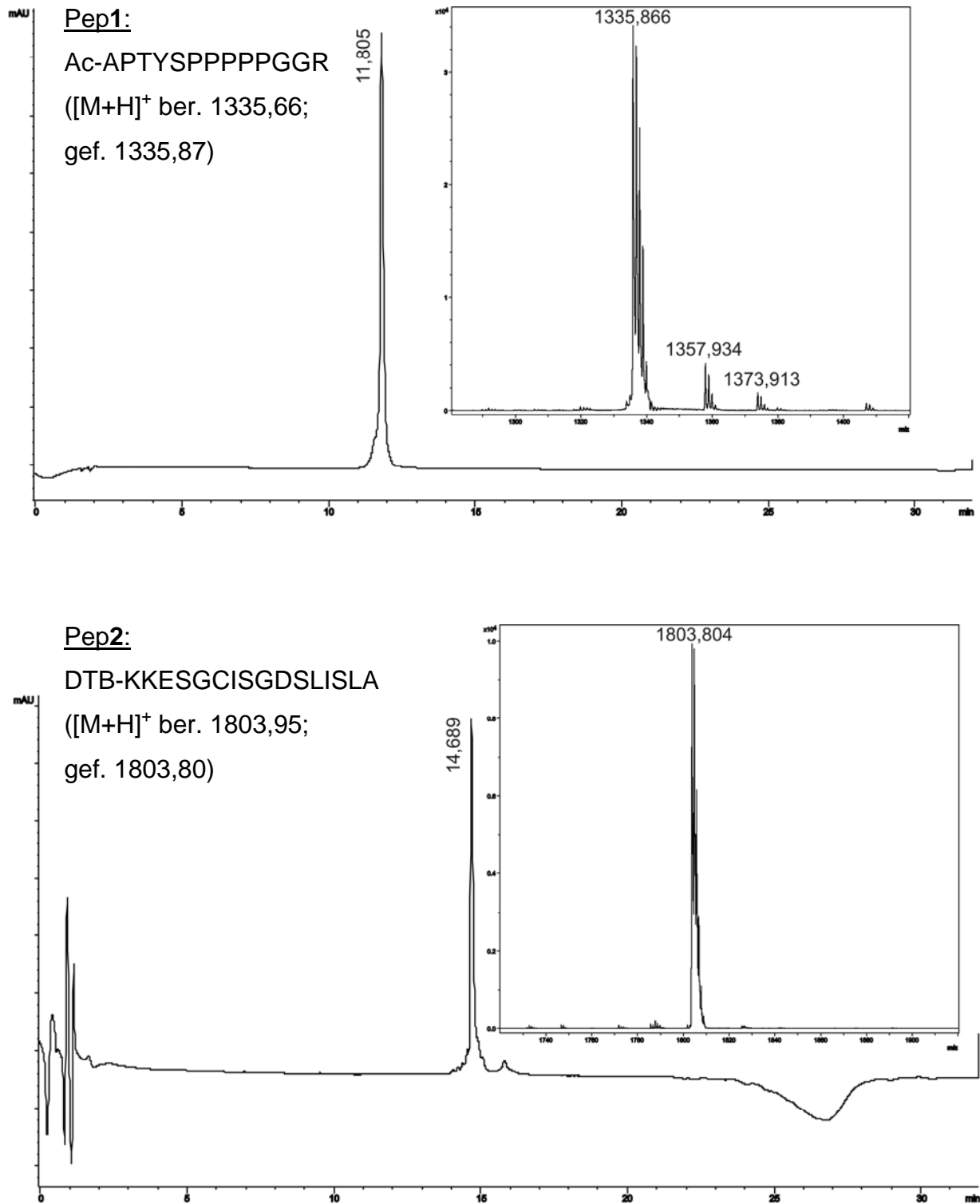
Übersicht der verwendeten, synthetischen Peptide

Abbildung 107. HPLC- und MALDI/TOF-MS-Spektren der verwendeten Peptide Pep1 und Pep2. Das MALDI/TOF-MS-Spektrum ist in das HPLC-Spektrum eingebettet. Für das HPLC-Spektrum ist die Retentionszeit des bezeichneten Signals in min vermerkt. (Ac: acetylierte Aminosäure, DTB: N-terminale Modifikation mit Desthiobiotin)

14. Danksagung

Mein aufrichtiger Dank gilt zuerst Herrn Professor Dr. Henning D. Mootz für die Möglichkeit, das weitreichende und äußerst interessante Themengebiet der Proteinevolution in seiner Arbeitsgruppe untersuchen zu dürfen. Besonders in den Zeiten, als Teile der Projekte nicht die erhofften Resultate erbrachten, konnte er in unseren Diskussionen Wege aufzeigen, um Problemstellungen anders zu behandeln. Weiterhin schien sein Repertoire an Ideen zu den hier beschriebenen und den unerwähnt gebliebenen Projekten unerschöpflich zu sein. Aber auch über die direkte Arbeit im Labor hinaus, wird mir Henning nicht nur als Chef sondern auch als Mensch in guter Erinnerung bleiben.

Für die Übernahme des Zweitgutachtens, trotz des großen Umfangs dieser Doktorarbeit, möchte ich ganz herzlich Herrn Professor Dr. Lars-Oliver Essen danken.

Herrn Professor Dr. Norbert Hampp und Herrn Professor Dr. Eric Meggers danke ich dafür, dass sie sich bereit erklärt haben, Mitglieder der Prüfungskommission zu sein.

In besonders guter Erinnerung werde ich die freundliche Atmosphäre unter allen Mitgliedern des Arbeitskreises Mootz behalten, die sich nicht nur auf den Laboralltag beschränkte. Hierbei gilt mein besonderer Dank Tim Sonntag bezüglich Fragen rund um das Thema Hefe, Joachim Zettler für seine unermüdliche Unterstützung in Sachen HPLC und MALDI sowie Dr. Christina Ludwig, die mir hilfreich zur Seite stand, als die Synthese neuer Peptide in Dortmund notwendig war. Außerdem möchte ich den „alten“ Mitgliedern des AK Mootz (Steffen Brenzel, Dr. Thomas Kurpiers, Dr. Christina Ludwig, Tim Sonntag und Joachim Zettler) danken, dass durch ihre Mithilfe der Umzug von Marburg nach Dortmund relativ reibungslos verlief. Für die schnelle und kritische Durchsicht dieser Doktorarbeit seien Tim Sonntag und Ilka V. Thiel besonders herzlich gedankt.

Für die gute Zusammenarbeit während der Zeit in Marburg möchte ich den AKs Marahiel und Essen meinen Dank aussprechen. Hierbei seien besonders erwähnt: Dr. Jan Grünewald und Dr. Christoph Mahlert (Peptidsynthese und Fluoreszenzspektroskopie), Dr. Uwe Linne (Massenspektrometrie) sowie Stefan Samel.

Außerdem wird die Marburger Zeit für mich immer durch die Freundschaft zu Dr. Jan Grünewald, Dr. Wilfried Hess, Dr. Holger Kramer und Dr. Christoph Mahlert geprägt sein, die inzwischen in der gesamten Welt verstreut sind.

Für ihren Beitrag zu Teilen dieser Arbeit danke ich den Vertiefungsstudenten Markus Funk und Holger Webert sowie der Masterstudentin Ilka V. Thiel.

Abschließend sei es mir gestattet, einen ganz besonderen Dank an meine Mutter und meine Schwester Janine zu richten, die durch ihre unermüdliche Unterstützung den Abschluss dieser Doktorarbeit nicht nur gefördert sondern auch ermöglicht haben. Sie waren mir besonders in den schweren Stunden, die während der Arbeit und darüber hinaus auftraten, ein Quell des Trostes.

Erklärung

Ich versichere, dass ich meine Dissertation

„Gerichtete Proteinevolution als Werkzeug zur Generierung funktionell und strukturell neuartiger Proteine“

selbständig, ohne unerlaubte Hilfe angefertigt und mich dabei keiner anderen als der von mir ausdrücklich bezeichneten Quellen und Hilfen bedient habe.

Die Dissertation wurde in der jetzigen oder einer ähnlichen Form noch bei keiner Hochschule eingereicht und hat noch keinen sonstigen Prüfungszwecken gedient.

(Ort, Datum)

(Unterschrift mit Vor- und Zuname)